

**Einfluss von Salzstress und Pilzbesiedlung auf
ausgewählte Parameter des Metabolismus von
Ammophila arenaria (L.) Link**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)
genehmigte
Dissertation

von Margareta Porada
aus Gdingen / Polen

1. Referentin: Privatdozentin Dr. Barbara Schulz
2. Referent: apl. Professor Dr. Jörn-Michael Wettern
eingereicht am: 20.11.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.02.2007
Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Porada, M., Zuccaro, A., Wagner, S., Bittner, F. & Schulz, B.

Does fungal colonization alleviate the effect of salt stress on *Ammophila arenaria*.

(Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Göttingen (2005).

Porada, M., Zuccaro, A., Wagner, S., Bittner, F. & Schulz, B.

Does fungal colonization alleviate the effect of salt stress on *Ammophila arenaria*.

(Poster) Botanikertagung, Braunschweig (2004).

Porada, M., Wagner, S. & Schulz, B.

Effect of salt stress on the physiology of *Ammophila arenaria* colonized with endophytic fungi. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Braunschweig (2004)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. habil. Barbara Schulz für die Vergabe des interessanten Themas, ihre Betreuung, ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Aust danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe.

Frau Dr. Alga Zuccaro danke ich für die vielen Ideen, ihren zeitlichen Aufwand, ihre Hilfe und ihre Mitwirkung im Laboratorium und nicht zuletzt für ihre konstruktive Kritik und ihre aufbauenden Worte.

Bei Herrn Dr. Stefan Wagner bedanke ich mich ebenfalls für die stete Hilfe beim Lösen von Problemen (besonders bei der HPLC), für die vielen Ratschläge, seine Aufmerksamkeit, die konstruktive Kritik und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Siegfried Draeger danke ich für die Unterstützung bei der Identifizierung von Pilzisolaten sowie für die vielen interessanten und unterhaltsamen Gespräche.

Bei Andreas Mitschke bedanke ich mich für seine Hilfe bei der Durchführung von molekularbiologischen Versuchen.

Mein Dank gebührt auch meinen Arbeitskollegen/Innen: Arlette Erhard, Gabi Günther, Katja Böhme, Kathrin Meier, Qunxiu Hu und Dr. Thomas dela Cruz für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, die bedeutend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Florian Bittner danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung von RT-PCR.

Herrn Dr. Jörn Petersen danke ich gleichermaßen für seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Dersch bedanke ich mich für die Übernahme des Kommissionsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. Michael Wettern danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Firma TECHLAB GmbH (Erkerode) danke ich für das Lösen der mit der HPLC zusammenhängenden Probleme sowie für die Bereitstellung von Geräten.

Besonders danke ich meiner Freundin Anja Spahn, dass sie immer für mich da war.

Mein Dank gebührt auch meiner Familie für die Liebe und Unterstützung.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie der Firma BASF, The Chemical Company, danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Für Anja

Inhaltsverzeichnis

I

Abkürzungsverzeichnis

V

1. Einleitung

1

1.1 Anpassungen an den osmotischen Stress (<i>osmotic adjustment</i>)	2
1.1.1 Was passiert bei osmotischem Stress?	2
1.1.2 Salztoleranz und die Mechanismen der osmotischen Anpassung bei den Pflanzen	3
1.1.3 Die Mechanismen der osmotischen Anpassung und Salztoleranz bei den Mikroorganismen	6
1.2 Interaktionen zwischen Pflanzen und Pilzen	7
1.3 Strandhafer (<i>Ammophila arenaria</i> L. Link)	13
1.4 Stickstoffmetabolismus der Pflanzen	14
1.4.1 Veränderungen im Aminosäurenpool	14
1.4.2 Ferredoxin-abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT)	15
1.4.3 Prolin	15
1.4.3.1 Prolinmetabolismus	15
1.4.3.2 Prolinfunktion	19
1.5 Veränderungen im Zucker- und Zuckeralkoholpool	21
1.6 Biomasse	25
1.6.1 Pflanzliche Biomasse unter Salzstresseinwirkung	25
1.6.2 Pflanzliche Biomasse unter Pilzbesiedlung	28
1.6.3 Pilzbiomasse unter Salzstresseinwirkung	30
1.7 ITS und 28S-rRNA als molekulares Target für die Identifizierung von Pilzspezies	32
1.8 Ziel der Arbeit	33

2. Material und Methoden

35

2.1 Arbeiten mit <i>Ammophila arenaria</i>	35
2.1.1 Herkunft und Oberflächensterilisation von Strandhafer	35
2.1.2 Anzucht von axenischen <i>A. arenaria</i> -Pflanzen	37
2.1.3 Kultivierungsbedingungen	38
2.2 Isolierung und Identifizierung der Pilzisolat sowie Reinfektionsversuche	38
2.2.1 Isolierung und Identifizierung der Pilzisolat	38
2.2.2 Reinfektionsversuche	39
2.3 Versuchsreihen mit <i>Ammophila arenaria</i>	39
2.3.1 Langzeitversuche	40
2.3.2 Kurzzeitversuche zur Untersuchung der Expressionsregulation von <i>AaPDH</i>	43
2.4 Lyophilisierung der Pflanzen und Bestimmung der Biotrockenmasse	44
2.5 Mikroskopische Untersuchungen	44
2.5.1 Präparation des Pflanzenmaterials	44
2.5.2 Infektionsversuche mit Pflanzensegmenten	45

2.6 Physiologische Untersuchungen der Pilzisolat	46
2.6.1 Salztoleranz der Pilzisolaten und ihre Wachstumsraten	46
2.6.2 Ausgewählte Parameter des Pilzmetabolismus unter Salzstress	46
2.6.3 Lyophilisierung des Pilzmaterials und Bestimmung der Pilzbiotrockenmasse	47
2.7 Biochemische Untersuchungen	48
2.7.1 Veränderungen im Aminosäure-Pool	48
2.7.1.1 Analytik von Aminosäuren mittels (HPLC)	48
2.7.1.2 Extraktion von freien Aminosäuren	48
2.7.1.3 Derivatisierung der Proben	51
2.7.1.4 Das HPLC-System und Aminosäureanalytik	52
2.7.1.5 Interner Standard	52
2.7.1.6 Kalibrierung der Säule	53
2.7.1.7 Identifizierung von Peaks und Ausrechnen der Konzentrationen	54
2.7.2 Veränderungen im Zucker- und Zuckeralkoholpool	54
2.7.2.1 HPLC-Analytik von Zuckern und Zuckeralkoholen bei <i>A. arenaria</i>	54
2.7.2.2 Extraktion von Zuckern und Zuckeralkoholen	55
2.7.2.3 Das HPLC-System	55
2.7.2.4 Kalibrierung der Säule	58
2.7.2.5 Identifizierung von Peaks und Ausrechnen der Konzentrationen	59
2.7.3 Bestimmung der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT	59
2.7.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität von P5CS	61
2.7.5 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)	63
2.8 Molekularbiologische Untersuchungen	64
2.8.1 Identifizierung der Pilzisolat über 28-rDNA- und ITS-Region	64
2.8.1.1 DNA-Isolierung	64
2.8.1.2 PCR-Bedingungen und Primer	64
2.8.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren	65
2.8.1.4 Sequenzierung und Datenbankenanalyse	66
2.8.2 Amplifikation der AaPDH von A. arenaria	66
2.8.2.1 Primerkonstruktion für die AaPDH- Amplifikation	66
2.8.2.2 Homologie unter bekannten pflanzlichen PDH-Proteinsequenzen	68
2.8.2.3 DNA-Isolierung aus <i>A. arenaria</i>	69
2.8.2.4 Bedingungen der Amplifikation von AaPDH	70
2.8.2.5 Direkte Klonierung von PCR-Produkten	71
2.8.2.6 Plasmid-DNA Präparation	72
2.8.2.7 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA und Insertkontrolle	73
2.8.2.8 PCR-Reaktion mit der Plasmid-DNA	73
2.8.2.9 DNA-Sequenzanalyse und Primeroptimierung	73
2.8.3 Untersuchungen zur Regulation der Genexpression von AaPDH mittels semiquantitativer reverser Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion	74
2.8.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA	75
2.8.3.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes	75
2.8.3.3 DNase-Verdau	75
2.8.3.4 Reverse Transkription	76
2.8.3.5 Housekeeping genes (Haushaltsgene) als externer Standard	76
2.8.3.6 Primer für die Amplifikation der AaPDH- 18S-rRNA- und β -Tubulin-Region	77
2.8.3.7 Bedingungen der RT-PCR	78
2.8.3.8 Sequenzierung und Analyse des RT-PCR-Produktes	79
2.8.3.9 Amplifikation der genomischen DNA aus <i>A. arenaria</i> mit den 18S-rDNA- und β -Tubulin-Primern sowie Sequenzierung und Datenbankenanalyse	80

2.9 Statistische Analyse	80
3. Ergebnisse	81
3.1 Die aus <i>A. arenaria</i> isolierten Pilzisolat	81
3.1.1 Bilanz der Isolierung von den Pilzisolaten	81
3.1.2 Reinfektionsversuche und die Auswahl von Pilzisolaten für die weiteren Experimente	83
3.1.3 Wachstumsmodi der Pilzisolat im pflanzlichen Gewebe	85
3.2 Bestimmungen der Biotrockenmasse	86
3.2.1 Die Einfluss von Salzstress auf die Biotrockenmasse von <i>A. arenaria</i>	86
3.2.2 Biotrockenmasse von <i>A. arenaria</i> nach Besiedlung mit den Endophyten und Pathogenen	87
3.3 Bestimmung der Salztoleranz sowie der Auswirkung von Salzstress bei den untersuchten Pilzisolaten	89
3.3.1 Biotrockenmasse von <i>A. strictum</i> TUB6911 und <i>F. culmorum</i> TUB6927 unter Salzstressbedingungen	89
3.3.2 Bestimmung der Salztoleranz und Wachstumsrate bei den Pilzisolaten	91
3.4 Einfluss von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf den Aminosäurenmetabolismus von <i>A. arenaria</i>	92
3.4.1 L-Prolin, L-Glutamin und L-Glutaminsäure	94
3.4.2 L-Asparaginsäure, L-Serin und L-Alanin	96
3.4.3 L-Asparagin und L-Valin	98
3.5 Einfluss von Salzstress auf den Aminosäurenmetabolismus der untersuchten Pilzisolat	100
3.6 Einfluss von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf den Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus von <i>A. arenaria</i>	102
3.7 Spezifische Aktivität der Fd-GOGAT von <i>A. arenaria</i>	105
3.8 Spezifische Aktivität der P5CS von <i>A. arenaria</i> und den untersuchten Pilzisolaten	108
3.9 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	110
3.9.1 Identifizierung der Pilzisolat mittels 28S-rDNA- und ITS-Region sowie ihre Charakteristika	110
3.9.2 Regulation der Genexpression von <i>AaPDH</i>	112
3.9.2.1 Amplifikation von <i>AaPDH</i> mit dem neu entwickelten Primerpaar	112
3.9.2.2 Insertkontrolle sowie die PCR mit der Plasmid-DNA	113
3.9.2.3 DNA-Sequenzanalyse der klonierten PCR-Produkte und die Datenbankanalyse	114
3.9.2.4 Optimierung von Primern	115
3.9.3 Regulation der <i>AaPDH</i> -Expression nach langzeitiger Salzstresseinwirkung oder nach der Inokulation mit den Pilzisolaten	116
3.9.4 Regulation der <i>AaPDH</i> -Expression nach kurzzeitiger Salzstresseinwirkung	116
3.9.5 Analyse der 18S-rRNA und β -Tubulin-Amplifikate	118
3.9.6 Sequenz- und Datenbankanalyse	118
3.9.6.1 Sequenzanalyse des <i>AaPDH</i> -RT-PCR-Produktes	118
3.9.6.2 Sequenzanalyse der genomischen β -Tubulin- und 18S-rDNA-Produkte	119
3.9.7 Datenbankenvergleich von pflanzlichen PDH-Proteinen	120

4. Diskussion	122
4.1 <i>A. arenaria</i> und die mit der Pflanze assoziierten Pilze	122
4.1.1 Zu den aus <i>A. arenaria</i> isolierten Pilzen	122
4.1.2 Wachstum der Pilze im pflanzlichen Gewebe	124
4.1.3 Die Identifizierung von Pilzspezies mittels <i>ITS</i> - und <i>28S-rRNA</i> -Region	125
4.1.4 Beschreibung der mittels <i>ITS</i> - und <i>28S-rRNA</i> -Region identifizierten Pilzisolat	127
4.2 Stickstoffmetabolismus von <i>A. arenaria</i>	130
4.2.1 Aminosäurenpool von <i>A. arenaria</i>	132
4.2.1.1 Aminosäurenpool nach Salzstresseinwirkung	132
4.2.1.2 Aminosäurenpool nach Pilzbesiedlung	133
4.2.2 Ferredoxin abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT) von <i>A. arenaria</i>	135
4.2.2.1 Fd-GOGAT nach Salzstresseinwirkung	135
4.2.2.2 Fd-GOGAT nach Pilzbesiedlung	136
4.2.3 Prolinmetabolismus von <i>A. arenaria</i>	137
4.2.3.1 Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) nach Salzstresseinwirkung	137
4.2.3.2 Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) nach Pilzbesiedlung	138
4.2.3.3 Regulation der Genexpression von Prolindehydrogenase (AaPDH) bei <i>A. arenaria</i>	140
4.3 <i>housekeeping genes</i>	143
4.4 Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus von <i>A. arenaria</i> nach Salzstresseinwirkung und Pilzbesiedlung	144
4.4.1 Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus nach Salzstresseinwirkung	144
4.4.2 Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus nach Pilzbesiedlung	145
4.5 Zur Auswirkung von Salzstress und Pilzbesiedlung auf die Biomasse von <i>A. arenaria</i>	147
4.5.1 Biomasse von <i>A. arenaria</i> nach Salzstresseinwirkung	147
4.5.2 Biomasse von <i>A. arenaria</i> nach Besiedlung mit den Pilzisolaten	150
4.6 Biotrockenmasse sowie ausgewählte Parameter des Pilzmetabolismus nach Salzstresseinwirkung	153
5. Zusammenfassung	156
6. Literaturverzeichnis	159
7. Anhang	174
Gekürztes Tabellenverzeichnis	211
Gekürztes Abbildungsverzeichnis	212

Abkürzungsverzeichnis

A	spezifische Aktivität
Aa	<i>Ammophila arenaria</i>
<i>A. arenaria</i>	<i>Ammophila arenaria</i>
ABA	Abcisinsäure
Abb.	Abbildung
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Ac. strictum</i>	<i>Acremonium strictum</i>
ADAM	1-Aminoadamantan
ADP	Adenosindiphosphat
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
<i>avr</i>	Avirulenzgen
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BTM	Biotrockenmasse
C	Kohlenstoff
C	Konzentration
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	<i>circa</i>
cDNA	<i>copy</i> DNA
cDPG	zyklisches 2,3-Phosphoglycerat
Cl	Chlorid
cm	Centimeter
cv.	Kultivar
CWDE	<i>cell wall-degrading enzymes</i>
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DK	Dänemark
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ERD	<i>early responsive to dehydration</i>
EST's	<i>expressed sequenced tags</i>
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
<i>F. culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
Fd	Ferredoxin
Fd-GOGAT	Ferredoxin abhängige Glutamat-Synthase (Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase)
Fmoc	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
<i>G. graminis</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GK	L-Glutamylkinase
GPR	L-Glutamyl-Phosphat-Reduktase
GS	Glutamin-Synthetase
GSA	Glutamat-Semialdehyd
H	Wasserstoff
h	Stunde
<i>HKT</i>	<i>high-affinity K⁺ transporter</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
IPTG	Isopropylthiogalactosid

ITS	internal transkribierender Spacer
K	Kalium
kDa	Kilodalton
KM	Kartoffel-Möhre
L	Liter
L-Ala	L-Alanin
L-Arg	L-Arginin
L-Asp	L-Asparagin
L-Asp	L-Asparaginsäure
LB	Luria Broth
L-Gln	L-Glutamin
L-Glu	L-Glutaminsäure
L-Gly	L-Glycin
L-His	L-Histidin
L-Iso	L-Isoleucin
I-Leu	L-Leucin
L-Lys	L-Lysin
L-Nor	L-Norvalin
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Pro	L-Prolin
L-Ser	L-Serin
Lsg.	Lösung
LSU	<i>large subunit</i>
L-Thr	L-Threonin
LTP	<i>lipid transfer protein</i>
L-Val	L-Valin
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
M	Mol
<i>M. bolleyi</i>	<i>Microdochium bolleyi</i>
mg	Miligramm
min	Minute
mL	Mililiter
mm	milimeter
mM	Milimol
mRNA	messenger RNA
M&S	Murashige & Skoog
MSC's	<i>mechanosensitive ion channels</i>
mV	Milivolt
n	Anzahl der untersuchten Proben
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NAD	Nicotinamiddinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) reduziert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHX	<i>Na⁺/H⁺ exchanger</i>
nm	Nanometer
NS	Nordsee
O ₂	Sauerstoff
OAT	Ornithin-Aminotransferase
OD	optische Dichte
ODS	Octadecylsilan
OS	Ostsee
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
ox.	oxidiert
p	<i>p</i> -Wert; das Ergebnis eines statistischen Signifikanztests
P5C	Pyrrolin-5-Carboxylat
PDH	Prolindehydrogenase
PGP-HSF	<i>plant growth promotor-hyaline sterile fungus</i>
POX	Prolinoxidase

PR	<i>pathogenesis related</i>
PS	Photosystem
R ²	Korrelationskoeffizient
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
red.	reduziert
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>RT</i>	Retentionszeit
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
RubisCO	Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase-Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-Biphosphat
RWC	<i>relative water content</i>
RWR	relative Wachstumsrate
s	Sekunde
S	Svedberg'sche Sedimentationskonstante
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sog.	so genannte
sp.	Spezies
SSU	<i>small subunit</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq.</i>	<i>Termus aquaticus</i>
TE	TRIS-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TnI	Tage nach Inokulation
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUB	Technische Universität Braunschweig
U	Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
V	Volumen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VAC's	<i>volume activated channels</i>
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
x	Peakfläche
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid
y	Substanzkonzentration
z.B.	zum Beispiel
P5CDH	Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase
P5CR	Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase
P5CS	Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase
Delta t	Zeitintervall
ϵ_{mol}	molarer Extinktionskoeffizient
%	Prozent
±	Standardabweichung

1. Einleitung

Pflanzen werden vielen Stressfaktoren ausgesetzt, die sich negativ auf ihre Entwicklung und ihre Produktivität (Blüten-, Samen-, Fruchtbildung) auswirken und welche in extremen Fällen zum Absterben führen können. Abiotischer Stress wird durch zu starke oder zu schwache Lichtintensitäten, zu hohe bzw. zu niedrige Temperaturen, Störungen in der Zufuhr von anorganischen Substanzen oder durch die Exposition zu Schwermetallen und anderen toxischen Substanzen natürlichen bzw. anthropogenen Ursprungs verursacht (BOHNERT & SHEVELEVA, 1998; CHEN & MURATA, 2002). Auch der osmotische Stress, bedingt durch Trockenheit, Wassermangel, Salinität oder extrem hohe Temperaturen, ist in natürlicher Umgebung ein limitierender abiotischer Faktor für die Organismen. In den semitrockenen Gebieten wird besonders die landwirtschaftliche Produktion durch die zunehmende Salinisierung der Böden beeinträchtigt, die auf die Irrigationspraktiken zurückzuführen ist (RODRIGUEZ *et al.* 1997; KNIGT & KNIGHT, 2001; ZHU, 2001; MUNNS, 2002; MÜHLING & LÄUCHLI, 2002).

Pflanzen werden auch mit biotischem Stress (Parasitismus, Infektionen) konfrontiert, verursacht z.B. durch den Viren-, Bakterien-, Pilz- oder Nematodenbefall. Handelt es sich um eine Besiedlung mit pathogenen Organismen, kommt es in den meisten Fällen zum Ausbruch einer pflanzlichen Erkrankung. Im Fall von endophytischen Pilzen entsteht eine symptomlose Infektion, die unter für die Pflanze ungünstigen Bedingungen in einer Krankheit münden kann. Bei den endophytischen Pilzpartnern ist bekannt, dass sie der Wirtspflanze u.a. Krankheitsresistenzen und Trockenheitstoleranz verleihen sowie wachstumsfördernd wirken können (VAN DER PUTTEN *et al.* 1988; SCHULZ *et al.* 1999; REDMAN *et al.* 2001). Gleiches gilt für pathogene Pilze im Rahmen einer induzierten Resistenz (STEINER & SCHÖNBECK, 1997).

Da die biotischen und abiotischen Stressfaktoren die Persistenz der Pflanzen in den meisten Fällen negativ beeinflussen, ist es für die Pflanzen unentbehrlich Mechanismen zu besitzen bzw. zu entwickeln, die eine Adaptation an neue Bedingungen erlauben. Von großer Bedeutung sind dabei protektive Strategien, die zur Aufrechterhaltung des zellulären Metabolismus und zum Schutz vor Schäden zellulärer Komponenten dienen (WOOD *et al.* 1996; LEBEDA *et al.* 2000; CHEN & MURATA, 2002).

1.1 Anpassungen an den osmotischen Stress (*osmotic adjustment*)

1.1.1 Was passiert bei osmotischem Stress?

Der osmotische Druck der Umgebung repräsentiert eine kritische Größe, die das Zellwachstum beeinträchtigt. Die Fähigkeit von Organismen zur Adaptation an Veränderungen des externen osmotischen Druckes sowie die Befähigung zur Osmoregulation stellen fundamentale Eigenschaften dar, die das Überleben unter solchen Bedingungen gewährleisten. Die Veränderung der Osmolarität in der Umwelt der Organismen, verursacht meistens durch steigende Na^+ - Konzentrationen außerhalb der Zellen, resultiert in Wasserverlust, was sich negativ auf das Zellvolumen auswirkt. Dies beeinflusst direkt die Konzentration intrazellulärer Metabolite und führt somit zur Inhibition diverser zellulärer Prozesse (z.B. Inhibition der Proteinaktivitäten, Hemmung des Wachstums) (VREELAND, 1987; ROBERTS, 2000). Aufgrund eines osmotischen Ungleichgewichtes fließt Wasser von einem Kompartiment mit einer hohen Wasseraktivität (niedrige Solutkonzentration) in solches, in dem eine geringere Wasseraktivität (hohe Solutkonzentration) herrscht. Dabei diffundiert Wasser durch die Lipiddoppelschicht der Membranen. Ferner wurde bei den Organismen die Existenz von ubiquitär vorkommenden definierten Kanälen festgestellt, die für den Wassertransport zuständig sind. Hierzu zählen Aquaporine (bei Tieren, Pflanzen, Pilzen und Eubakterien) sowie Aquaglyceroporine (bei Pilzen und Eubakterien) (ROBERTS, 2000; HILL *et al.* 2004). HILL *et al.* (2004) postulierten jedoch, dass die Aquaporine hauptsächlich eine Sensorfunktion haben, indem sie auf die Veränderungen des osmotischen oder Turgordruckes reagieren. Die von diesen Kanälen vermittelten Informationen tragen u.a. zur Kontrolle des Turgordruckes und des Zellvolumens bei. Darüber hinaus besitzen Eukaryoten und Eubakterien die sog. MSC's (*mechanosensitive ion channels*) und VAC's (*volume activated channels*), die gleichermaßen eine Sensorfunktion ausüben. Sie tragen zur Herstellung des osmotischen Gleichgewichtes bei, indem sie die Solute in die Zelle befördern (bei hyperosmotischem Stress) bzw. bei ihrer Freilassung fungieren (bei hypoosmotischem Stress) (ROBERTS, 2000).

Bei den Pflanzen führt der osmotische Stress, durch die Veränderungen des Wasserpotential- und Ionengleichgewichtes (z.B. für die K^+ -, Na^+ -, Cl^- -, und Ca^{+2} - Ionen) zwischen dem Apoplasten und Symplasten, zur Zerstörung der zellulären Homöostase. Na^+ inhibiert die meisten Enzyme ab Konzentrationen von ca. 100 mM, dasselbe gilt auch für Cl^- -Ionen. Von dem für die Pflanzen essentiellen K^+ -Ion ist bekannt, dass es sich bei Konzentration zwischen 100 und 200 mM toxisch auf die cytoplasmatischen Enzyme

auswirken kann (NIU *et al.* 1995; HASEGAWA *et al.* 2000; LOHAUS *et al.* 2000; ZHU, 2001; MUNNS, 2002; YOKOI *et al.* 2002). Der osmotische Stress verändert auch die Transpirationsrate der Blätter und das Wasserpotential in den Wurzeln (PASSIOURA & MUNS, 2000).

1.1.2 Salztoleranz und die Mechanismen der osmotischen Anpassung bei den Pflanzen

Pflanzen, die in salinen Habitaten (Mangroven, Salzwiesen und –Marschen) zu wachsen vermögen, werden Halophyten genannt. Diese Pflanzen sind resistent gegenüber höheren Salzkonzentrationen. Nicht selten ist eine NaCl-Konzentration von 170 mM bis 340 mM für ihr Wachstum erforderlich. Der Halophyt *Suaeda maritima* hat sein Wachstumsoptimum bei 200 mM, toleriert jedoch Salinitäten bis zu 1000 mM NaCl.

Die an Süßwasser adaptierten Pflanzen werden Glycophyten genannt. Sensitive Glycophyten zeigen schon bei 50 mM NaCl Anzeichen von osmotischem Stress (z.B. Soja oder Bohne). Tolerante Spezies (z.B. Zuckerrübe) können bis 200 mM NaCl vertragen (HARBORNE, 1993; VOLKMAR *et al.* 1998; MUNNS, 2002).

Halophyten und Glycophyten entwickelten unterschiedliche Strategien in Umgang mit hohen Salzgehalten. Der zentrale Unterschied besteht darin, dass Halophyten die Fähigkeit besitzen, die in hohen Konzentrationen toxisch wirkenden Na^+ -, Cl^- und Ca^{+2} -Ionen vom Cytoplasma fernzuhalten, indem sie sie mit Hilfe eines energieabhängigen Transports in die Vakuole befördern. Das hohe osmotische Potential innerhalb der Vakuole wird durch die im Cytoplasma und im Lumen, Matrix oder Stroma von Organellen akkumulierten kompatiblen Solute ausgeglichen. Glycophyten sind ebenfalls imstande einen Teil des Salzes aus der Pflanze zu entfernen und bilden auch kompatiblen Solute. Jedoch fehlt ihnen die Fähigkeit zur effektiven Kompartimentierung von toxischen Ionen. Dauert der Salzstress längere Zeit an, kommt es zur Anreicherung von Na^+ - und Cl^- -Ionen im Apoplasten transpirierender Blätter. Die Zunahme des osmotischen Gradienten zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle erzwingt den Wasserausstrom aus der Zelle und führt somit zur Dehydrierung (DIETZ, 1997; VOLKMAR *et al.* 1998; HASEGAWA *et al.* 2000).

Um dem osmotischen Stress entgegenzuwirken haben Pflanzen adaptive Strategien entwickelt, die ihnen das Überleben unter Wasser- und Salzstressbedingungen ermöglichen und die in mehrere Kategorien unterteilt werden können. Hierzu zählen die Veränderungen von Entwicklungseigenschaften (z.B. Blütenzeit), Struktureigenschaften (Beschichtung / Bewachsung von Blättern) und physiologischen Mechanismen (z.B. Fähigkeit zur parallelen Salzausscheidung und Wasseraufnahme, Kompartimentierung

von toxischen Ionen innerhalb der Vakuole, Veränderungen der Photosyntheserate, des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus) sowie die Bildung von kompatiblen Soluten (Osmoprotektanten) (DELAUNEY & VERMA, 1993; VERMA, 1999). Durch die Kontrolle der Salzaufnahme (z.B. die Salzausscheidung), die sich in der Selektivität der Wurzelionenkanäle, Beladen von Xylem sowie einem schnellen Pflanzenwachstum zeigt, kann der Salzgehalt in der Pflanze reduziert werden (Abb. 1.1) (SINGH & CHATRATH, 2001). LOHAUS *et al.* (2000) berichten über eine Retranslokation von Salzionen via Phloem, was die Pflanze vor einer Salzakkumulierung in den expandierenden Blättern schützt. Darüber hinaus können die durch die exzessive Ionenaufnahme entstandenen Schäden durch eine Lokalisierung der Salzionen innerhalb der älteren Blätter kompensiert und somit die neuen, transpirierenden geschützt werden. Auch einige Halophyten scheiden das Salz durch spezielle Drüsen oder Blasen aus (BOHNERT *et al.* 1995; HASEGAWA *et al.* 2000; YOKOI *et al.* 2002) (vgl. Abb. 1.1).

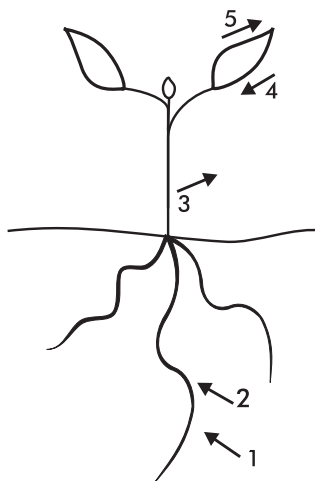


Abb. 1.1 Kontrollpunkte, an denen die Pflanze den Salztransport reguliert: 1. Selektive Aufnahme vom Boden; 2. Beladen von Xylem; 3. Salz entfernen aus dem Xylem in den oberen Pflanzenteilen; 4. Beladen von Phloem und 5. Salzausscheidung durch die Salzdrüsen oder Blasen. Für eine salztolerante Pflanze, die in einer 100 mM NaCl-Lösung wächst liegt die NaCl-Konzentration der Wurzeln bei ca. 50 mM, die des Xylems bei 5 mM und die der älteren Blätter bei 500 mM (Quelle: MUNNS *et al.* 2002).

MUNNS (2002) berichtet, dass bei den Tabakpflanzen, die mit 430 mM NaCl gestresst wurden, die Konzentration von Na^+ und Cl^- in den Vakuolen jeweils bei 625 und 780 mM lag. Ein so hoher osmotischer Druck innerhalb der Vakuole muss ausgeglichen werden, um den Wasserstatus der Zelle aufrechtzuerhalten. Die osmoprotektiven Substanzen haben u.a. die Aufgabe, durch Erhöhung des osmotischen Druckes im Cytoplasma, die Protein- und Membranstabilisierung zu erhöhen und sind daher von zentraler Bedeutung (BOHNERT *et al.* 1995; NIU *et al.* 1995; RODRIGUEZ *et al.* 1997; MCNEIL *et al.* 1999; HASEGAWA *et al.* 2000; SINGH & CHATRATH, 2001; YOKOI *et al.* 2002; DI MARTINO *et al.* 2003). Zu den am meisten in den Pflanzen synthetisierten Osmoprotektanten gehört Prolin (YOSHIBA *et al.* 1997; HARE & CRESS, 1997; BOHNERT *et al.* 1995; RAYMOND & SMIRNOFF, 2002) (vgl. 1.4.3). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Einwirkungen von Salzstress und Pilzbesiedlung u.a. auf den Metabolismus dieser Aminosäure untersucht (s. 2.7.1; 2.7.4 und 2.8.2).

Die Osmoprotektanten kommen in fast allen Organismen vor. Sie sind bei Archaea, Eubakterien, Algen, Protozoen, höheren Pflanzen sowie Tieren anzutreffen. Es sind lösliche Komponenten, die sich in höheren Konzentrationen nicht toxisch auf die Enzyme auswirken und keinen Einfluss auf den pH-Wert oder die Nettoladung der Zelle nehmen (McNEIL *et al.* 1999). Zu ihnen gehören essentielle Ionen, wie z.B. K^+ . Die meisten Osmoprotektanten sind jedoch organischer Herkunft. Einfache Zucker (Fructose, Glucose), Zuckeralkohole (Glycerol und methylierte Inositole) sowie komplexe Zucker (Trehalose, Raffinose und Fructane) bilden dabei die Hauptgruppe. Ergänzt wird diese durch quartäre Aminosäurederivate (Prolin, Glycinbetain, β -Alaninbetain, Prolinbetain), tertiäre Amine (1,4,5,6-Tetrahydro-2-Methyl-4-Carboxyl-Pyrimidin) und schwefelhaltige Substanzen, wie Sulfat oder Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) (VERMA, 1999; YOKOI *et al.* 2002). Welche kompatiblen Solute gebildet werden ist jedoch von Organismus zu Organismus unterschiedlich (VERMA, 1999; YOKOI *et al.* 2002).

Die kompatiblen Solute haben außer Osmoprotektion noch andere wichtige Funktionen. Sie fungieren, wie z.B. Prolin, als Fänger von freien Radikalen und unterstützen somit in den gestressten Pflanzen die schon vorhandenen Schutzmechanismen zum Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. die Superoxiddismutase oder die Ascorbatperoxidase) (BOHNERT & SHEVELEVA, 1998; HASEGAWA *et al.* 2000). Die Osmoprotektanten (z.B. Prolin) dienen auch als Kohlenstoff- und Stickstoffspeicher für die Pflanze, nachdem der osmotische Stress überstanden ist (RAYMOND & SMIRNOFF, 2002). Da die kompatiblen Solute hydrophil sind, wird vermutet, dass sie unter Wasserstressbedingungen die Hydrathülle von den Proteinen, Proteinkomplexen und Membranen ersetzen. Somit könnten sie sowohl eine osmoprotektive Funktion ausüben als auch als niedermolekulare Chaperone fungieren. Im Cytoplasma vorhanden können Osmoprotektanten die inhibitorischen Effekte von den toxischen Ionen auf die Enzyme aufheben, die Enzymstabilität erhöhen sowie Dissoziationen von den Enzymkomplexen verhindern. Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht ihre Gesamtmenge in der Zelle, sondern die lokale Konzentration auf der zu schützenden Oberfläche von Bedeutung ist (HASEGAWA *et al.* 2000).

Die Aufnahme von Natrium in die pflanzlichen Zellen erfolgt mittels Transporter aus der HKT (*high-affinity K^+ transporter*) -Familie, die als Na^+ -Uniporter bzw. K^+ - und Na^+ -Symporter fungieren. Die gleichen Transporter sind auch für den Na^+ -Transport innerhalb der Pflanze zuständig. Bei den Pilzen wird diese Funktion den TRK-Transportern zugesprochen (RODRIGUEZ-NAVARRO & RUBIO, 2006; PLATTEN *et al.* 2006).

In der salinen Umgebung ist die Ionhomöostase und der Transport von Soluten von den Membranproteinen (aktive Transporter und Kanäle) abhängig, die eine Translokation von z.B. H^+ - oder Ca^{+2} -Ionen (Ca^{+2} -ATPase) gewährleisten (HASEGAWA *et al.* 2000). Der aktive Transport und der elektrophoretische Fluss durch die Plasmamembran oder Tonoplast wird durch den elektrochemischen Potentialgradienten von H^+ -Ionen sichergestellt. Zur Entstehung des genannten Gradienten tragen vor allem die schon erwähnten H^+ -Pumpen bei, zu denen die in der Plasmamembran lokalisierte H^+ -ATPase und die im Tonoplast vorkommenden H^+ -ATPase und H^+ -Pyrophosphatase gehören. Ihre Aktivität wird unter Salzstressbedingungen erhöht (HASEGAWA *et al.* 2000; GAXIOLA *et al.* 2001).

1.1.3 Die Mechanismen der osmotischen Anpassung und Salztoleranz bei den Mikroorganismen

Unter den Mikroorganismen existieren halotolerante bzw. halophile Vertreter, die imstande sind mit hohen NaCl-Konzentrationen umzugehen. Halophile Archaea (z.B. *Halothermotrix orenii*) oder Eubakterien (z.B. *Desulfovibrio retbaense*) tolerieren bis zu 2,5 M NaCl. Für die grüne Alge *Dunaliella*, die als wichtigster Eukarotenvetreter ubiquitär in salinen Habitaten und als einziger Primärproduzent im Toten Meer (5,2 M NaCl) vorkommt, hat sich die Salzkonzentration von 1 M NaCl als wachstumsfördernd herausgestellt (OREN, 2002). Unter den Pilzen finden sich halotolerante (z.B. *Debaromyces hansenii*) bzw. xerotolerante (z.B. *Saccharomyces rouxii*) Hefen (0,8 M NaCl) (REED *et al.* 1987; FÖRSTER *et al.* 1998) sowie in marinen Habitaten lebende halotolerante Pilze, wie z.B. *Dendryphiella salina* (0,6 M NaCl) (PATON & JENNINGS, 1988).

Die halotoleranten und halophilen Mikroorganismen, die unter einem hohen osmotischen Druck zu leben vermögen, entwickelten verschiedene Strategien, die ihnen das Überleben in der salinen Umgebung ermöglichen. Nur eine Gruppe der Eubakterien aus der Gattung *Halanaerobiales* sowie die zu aeroben *Halobacteriales* gehörenden halophilen Archaea verwenden zum Schutz von hohen Salinitäten den sog. „salt in“- Mechanismus. Dabei werden K^+ - und Cl^+ - Ionen in der Zelle akkumuliert und tragen somit zum osmotischen Gleichgewicht bei. Bioenergetisch erfordert diese Strategie geringe Mengen an Energie (OREN, 2002). Bei halophilen Archaea, die extrem hohe intrazellulären K^+ - Konzentrationen haben, werden vorherrschend saure Proteine gebildet. Diese beinhalten einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) und einen geringen Gehalt an hydrophoben Aminosäureresten. Diese Proteine benötigen für ihre optimale Faltstruktur sowie ihre Aktivität das Vorhandensein von strukturstabilisierenden K^+ - Ionen (OREN, 2002).

Eine andere osmoadaptive Strategie, die jedoch mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist, beruht auf der Entfernung der Salze aus dem Cytoplasma. Zum Ausgleich des osmotischen Potentials werden dabei innerhalb der Zelle organische Solute synthetisiert. Bei den Mikroorganismen finden sich dabei osmotisch wirkende Substanzen, die ubiquitär bei den Archaea, Eubakterien und Eukaryoten vorkommen. Hierzu zählen beispielsweise Glycerol und andere Zuckeralkohole, Aminosäuren und deren Derivate (Glycinbetain, Ectoin) oder einfache Zucker, wie Trehalose und Saccharose. Die Eubakterien produzieren vorwiegend Ectoin und Glycinbetain. Die Pilze bilden vorwiegend Zucker (Trehalose) und Zuckeralkohole (Mannitol, Glycerol, Erythritol oder Rybitol) (REED *et al.* 1987; FÖRSTER *et al.* 1998; MANAGBANAG & TORZILLI, 2002; RAMIREZ *et al.* 2004). Die heterotrophen parasitären Algen aus der Gattung *Phytophthora* (Oomyceten) bilden Prolin als Antwort auf den osmotischen Stress (AMBIKAPATHY *et al.* 2002). Die Grünalge *Dunaliella* verwendet hauptsächlich Glycerol, um den osmotischen Druck in den Zellen auszugleichen (OREN, 2002).

Die Synthese von organischen Osmolyten wurde auch für die Archaea nachgewiesen. Dabei werden von diesen Mikroorganismen die gleichen Osmolyten produziert, die auch für die Pflanzen, Pilze und Eubakterien charakterisiert wurden (OREN, 2002). Darüber hinaus bilden die Archaea Substanzen, die ausschließlich bei ihnen anzutreffen sind. Hierzu zählen z.B. zyklisches 2,3-Phosphoglycerat (cDPG), 1,3,4,6-Hexantetracarbonsäure, Polyanione (ROBERTS, 2000) oder 2-Sulfotrehalose (*Natronococcus occultus*) (OREN, 2002).

Die Osmolyten werden als Antwort auf den osmotischen Stress nicht immer *de novo* synthetisiert. Glycinbetain z.B. wird aktiv in die Zellen aufgenommen und kann somit den schon vorhandenen Pool an kompatiblen Soluten ersetzen. Es wurden bei den Bakterien verschiedene Glycinbetain-Transportersysteme identifiziert. Hierzu zählt z.B. der ProP-Transporter aus *E. coli* oder der BetP-Transporter aus *Corynebakterium glutamicum*. Bekannt sind ebenfalls zwei Transportersysteme aus *Listeria monocytogenes* (ROBERTS, 2000).

1.2 Interaktionen zwischen Pflanzen und Pilzen

Pflanzen können von pathogenen und endophytischen Pilzen kolonisiert werden. Während eine Besiedlung mit den ersten direkt zu den Krankheitssymptomen führt, wachsen die Endophyten symptomlos in der Pflanze. Einige der Interaktionen zwischen endophytischen Pilzen und ihren pflanzlichen Partnern können einen mutualistischen, Ruhezustand- oder latent-pathogenen Charakter aufweisen (PETERS *et al.* 1998; SCHULZ *et al.* 1999; BOYLE *et al.* 2001; SCHULZ & BOYLE, 2005).

Nach PETRINI (1991) handelt es sich bei den Endophyten um Mikroorganismen, die in einem bestimmten Abschnitt ihres Lebenszyklus das innere Pflanzengewebe besiedeln können, ohne sichtbare Krankheitssymptome hervorzurufen. Hiernach kann es sich bei den Endophyten um Organismen handeln, die zeitweise epiphytisch leben oder um Pathogene, die eine lange latente Phase besitzen (WILLIAMSON, 1994; MARQUARDING, 1999).

Die Besiedlung von Pflanzen durch Pilze kann durchaus einen positiven Effekt auf die Erhöhung der Resistenz oder das Pflanzenwachstum ausüben, wie das bei den Interaktionen zwischen *Lolium multiflorum* oder *Festuca arundinacea* und den Endophyten aus der Gattung *Neotyphodium* der Fall ist (VILA-AIUB *et al.* 2005; RAHMAN & SAIGA, 2005).

Bei den endophytischen Pilzpartnern ist bekannt, dass sie in ihrem mutualistischen Status durch die Konzentrationserhöhung von Abwehrmetaboliten die antipathogene Wirkung besitzen oder sich durch die Exkretion von Phytohormonen positiv auf die Wirtspflanze auswirken können. Sie können dem Wirt Toleranz gegen Wasser-, Salz-, Hitzestress, Bodenacidität und Mangel an Mineralstoffen sowie gegen Parasiten verleihen (ERNST *et al.* 2003; MUCCIARELLI *et al.* 2003; ; RUDGERS *et al.* 2004; SCHULZ & BOYLE, 2005). Auch die Aktivität des Pflanzenmetabolismus kann erhöht werden (SCHULZ *et al.* 1999).

Von der Erhöhung der Salzstresstoleranz sowie der Zunahme der Biomasse im Vergleich zu nicht besiedelten Pflanzen wurde ebenfalls im Fall von mykorrhizierten Pflanzen berichtet (FENG *et al.* 2002; GIRI *et al.* 2003; BRUNDRETT, 2004; PORCEL & RUIZ-LOZANO, 2004; RABIE, 2005; CHO *et al.* 2006) (vgl. 1.6.2).

Allgemein können zu den die Pflanzen besiedelnden Isolaten schwache Parasiten, latente oder inkompatible Pathogene bzw. hemibiotrophe Arten gehören (SCHULZ *et al.* 1998). Es ist nicht bekannt, welche Kommunikationsart zwischen dem Wirt und dem Symbiont besteht, die sich in der Folge auf den Status des Pilzes in der Pflanze auswirkt (REDMAN *et al.* 2001). Nach REDMAN *et al.* (2001) wird der Pilzstatus durch den Austausch mit dem Symbiosepartner auf einer biochemischen bzw. genetischen Ebene geprägt, was auch für die arbuskuläre Mykorrhiza (AM)- Pilze bekannt ist. Darüber hinaus kann sie vom Wirtszustand sowie von den herrschenden Umweltbedingungen abhängen. SCHULZ *et al.* (1999) sowie SCHULZ & BOYLE (2005) plädieren für eine andere Theorie, nach der eine asymptomatische Kolonisierung des Wirtes durch den Pilz auf einem balancierten Antagonismus zwischen den Partnern beruht. Der Pilz (Endophyt) produziert zwar pflanzenschädigende Enzyme (z.B. Proteasen, Cellulasen oder Xylanasen) und phytotoxische Sekundärmetabolite, unterdrückt jedoch die Pflanzenabwehr nicht. Die Pflanze indessen wehrt sich gegen die Ausbreitung des kolonisierenden Pilzes (z.B. durch

die hypersensitive Antwort, wie die H_2O_2 -Bildung und die Erhöhung der Peroxidaseaktivität) und somit gegen den Ausbruch der Krankheit. Wird dieses Gleichgewicht zu Ungunsten der Wirtspflanze gestört, kann der Endophyt pathogene Eigenschaften entwickeln. Darüber hinaus beeinflussen in der Umwelt diverse Faktoren das Wachstum und die Vitalität der Pflanzen und somit ihre Abwehr sowie die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft. Hierzu zählen z.B. die Temperatur, die Lichtverhältnisse und die Bodeneigenschaften (pH-Wert, Salinität, Nährstoffgehalt und Acidität). Auch biotische Faktoren wie Konkurrenz unter den Organismen und Vorhandensein von Parasiten haben einen Einfluss (VAN DER PUTTEN *et al.* 1988, DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* 1995). WIRSEL *et al.* (2001) berichten z.B. über unterschiedliche Verteilung von *Trichoderma* sp., *Microdochium* sp. und *Cladosporium* sp. in *Phragmites australis* (Schilf) zwischen unterschiedlich bewässerten oder mit Sauerstoff versorgten Standorten.

Die erfolgreiche Besiedlung des Wirtes durch einen pathogenen bzw. nicht pathogenen Pilz erfolgt in mehreren Schritten. Als Erstes findet die Sporenanheftung an der Pflanzenoberfläche statt. Die adhäsive Funktion wird dabei von der schleimartigen Extrazellulären Matrix des Pilzes bestimmt, die aus Polysacchariden, Proteinen und Glycoproteinen besteht (MENDGEN & DEISING, 1993; EPSTEIN & NICHOLSON, 1997; LEBEDA *et al.* 2000). Um den Wirt zu penetrieren keimt die Spore aus (induziert z.B. durch die flüchtigen, von der Pflanze produzierten Substanzen, wie Ethylen) und bildet einen Keimschlauch. Sowohl der Keimschlauch als auch die extrazelluläre Matrix beinhalten Enzyme, die in die Degradierung der pflanzlichen Cuticula (Cutinasen) und der Zellwand (CWDE; *cell wall-degrading enzymes*) involviert sind. Zu den CWDE gehören Pectinabbauende Enzyme (z.B. Endopolygalacturonase, Endopectinlyase oder Pectinmethylesterase), Cellulasen (z.B. β -Glucosidase, β -1,4 -*endo*- bzw. -*exo*-Glucanase, Cellobiase), Depolymerasen der neutralen Polysaccharidmatrix (z.B. β -Xylosidase, β -1,4- Galactanase, *endo*- α -1,5-Arabinase, Mannase) und Proteasen, was für die nekrotrophen und hemibiotrophen Pilze nachgewiesen wurde (DE LORENZO *et al.* 1997; LEBEDA *et al.* 2000). Einige Pilze (z.B. Rostpilze) penetrieren jedoch die Cuticula und die Zellwand direkt, indem sie oft melaninhaltige Appressorien bilden und mit ihrer Hilfe durch die Stomata oder Gewebsverletzungen in die Pflanze gelangen (LEBEDA *et al.* 2000).

Ist der Durchbruch durch die Zellwand vollzogen, entstehen Penetrationshyphen, aus denen entweder die Pflanze kolonisierenden Infektionshyphen (z.B. bei *Magnaporthe grisea*), Haustorium-bildende Infektionshyphen (z.B. bei *Uromyces vicia-fabae*) oder die primäre Hyphen bildenden Infektionsvesikel auswachsen (z.B. bei *Colletotrichum*

lindemuthianum) (MENDGEN & DEISING, 1993). Das Wachstum der Pilze im pflanzlichen Gewebe kann intra- und interzellulär stattfinden. Sowohl bei den endophytischen als auch bei den parasitären Pilzen wurden spezialisierte Strukturen nachgewiesen, die zur Kolonisierung des Wirtes dienen (z.B. Appressorien, Haustorien oder Penetrationshyphen) (STONE *et al.* 1994, SCHULZ & BOYLE, 2005).

Im Kampf gegen die kolonisierenden Pilze kommen bei den Pflanzen die sog. Resistenzgene (*R*-Gene; Kultivar-spezifische Elicitorrezeptoren) zum Einsatz, die für die Erkennung der Avirulenzgene (*avr*; rassenspezifischer Elicitoren) von den Pilzen zuständig sind (Rasse-Kultivar-Spezifität) (CERVONE *et al.* 1997, MONTESANO *et al.* 2003). Der streng spezifischen Wirt-Pathogen-Beziehung liegt dabei eine Gen-für-Gen-Interaktion zu Grunde (STRASBURGER, 2002). Im Erkennungsfall wird eine Signalkaskade aktiviert, die anschließend zur hypersensitiven Antwort und Induktion von wirtsspezifischen Abwehrgenen führt. Die Interaktion zwischen Pilz und Pflanze wird dann als inkompatibel bezeichnet, wobei es zur keiner Krankheit kommt. In einer kompatiblen Interaktion dagegen werden die Avirulenzgene der Pilze von den pflanzlichen Resistenzgenen nicht erkannt oder sie fehlen vollständig, sodass das Pathogen die Pflanze infizieren kann, was zu einer Erkrankung führt. Ein Beispiel dafür bietet das Modellsystem *Lycopersicon esculentum* – *Cladosporium fulvum* (JOOSTEN *et al.* 1997). Eine andere Möglichkeit für die Pflanzen den Befall von pathogenen Pilzen abzuwehren stellt die wirtsunabhängige Spezifität dar, bei der die von den Mikroorganismen produzierten unspezifischen Elicitoren eine Abwehrreaktion in unterschiedlichen Pflanzespezies auslösen können (CERVONE *et al.* 1997; PETERS *et al.* 1998; SCHULZ *et al.* 1998).

In der Natur kann in Zusammenhang mit den pathogenen Mikroorganismen und dem Ausbruch einer pflanzlichen Krankheit das Phänomen der *induzierten Resistenz* eine wichtige Funktion haben (vgl. 1.6.2). Durch Resistenzinduktion wird schnell ein bereits latent in den Pflanzen vorhandenes Potential an Abwehrmechanismen zugänglich. Wird die Pflanze von z.B. Endophyten besiedelt, die die pflanzliche Abwehr aktivieren, kann durchaus einer durch die Pathogene ausgelösten Krankheit standgehalten werden (SCHÖNBECK *et al.* 1993). Der Einfluss der induzierten Resistenz auf das Abwehrverhalten der *A. arenaria*- Pflanzen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht getestet.

Bei der Erkennung der Pilze werden pflanzliche Abwehrmechanismen eingeschaltet, zu denen die hypersensitive Antwort (HR) (z.B. oxidative *burst* = Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie z.B. $O_2^{\bullet-}$ oder H_2O_2), die Akkumulierung von Acetylsalicylsäure (PETERS *et al.* 1998; ALVAREZ, 2000) oder die Aktivierung der Polyaminbiosynthese

gehören (MEHDY, 1994; ALVAREZ *et al.* 1998; WALTERS, 2003). Beobachtet wird auch die Verstärkung der Zellwand (Papillenbildung, Kallose- und Ligninablagerung) und Induktion der zellwandstrukturellen Hydroxypyrrrolin-reichen Glycoproteine (HRGPs) (CABRAL *et al.* 1993; SCHULZ *et al.* 1998; BISHOP *et al.* 2002). Es kommt ebenfalls zur Akkumulierung von antimikrobiellen Substanzen (Phytoalexinen, wie z.B. Pisatin oder Rishitin) (STRASBURGER, 2002) und PR- (*pathogenesis related*) Proteinen, wie z.B. Proteinasen oder Peroxidasen. Der Befall der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) mit dem Pilz *Alternaria alternata* führt z.B. zu erhöhten Mengen an *lipid transfer protein* (LTP) Ha-AP10 in den infizierten Pflanzensamen. Ha-AP10 gehört zu den *pathogenesis related* Proteinen. Seine Akkumulierung wurde auch in den salzgestressten *H. annuus*- Pflanzen festgestellt. Ha-AP10 zeigt in hohen Konzentrationen antimikrobielle Eigenschaften. Unklar ist jedoch, ob sich das Protein direkt auf das Pathogen auswirkt (antimikrobielles Protein) oder aber an der Vermittlung der pflanzlichen Abwehrreaktion auf einem bisher unbekannten Weg partizipiert (GONORAZKY *et al.* 2005). Zu den weiteren pflanzlichen Abwehrmechanismen gehört das Einschalten der Phenylpropanoidbiosynthese (erhöhte Phenylalanin-Ammonium-Lyase- (PAL)- Aktivität und die damit verbundene Biosynthese von Lignin oder Phenolen, wie z.B. Cumarin, Zimtsäuren und Phenolcarbonsäuren. Es werden gleichermaßen Enzyme synthetisiert, die die Zellwand der Pilze angreifen (Chitinasen, Glucanasen). Ferner wird Ethylen gebildet (CERVONE *et al.* 1997; PETERS, 1997; VIDHYASEKARAN, 1997; WALTERS, 2003). Die Regulierung der pflanzlichen Abwehr wird durch ein komplexes Netzwerk gesteuert, in das die Signalmoleküle: Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen involviert sind (DONG, 1998; KUNKEL & BROOKS, 2002).

Nekrotrophe Pilze töten die Pflanze ab, indem sie verschiedene Toxine (z.B. Victorin von *Cochlobolus victoriae* oder Fusiccocin von *Fussicoccum amygdali*) und phytotoxische Enzyme ausscheiden, um sich von totem Pflanzenmaterial zu ernähren (STRASBURGER, 2002; BIEMELT & SONNENWALD, 2006). Im Gegensatz dazu bleiben die von biotrophen bzw. hemibiotrophen Pilzen befallenen Pflanzenzellen am Leben und stellen somit eine Nährstoffquelle für die Pilze dar (LEBEDA *et al.* 2000).

Die biotrophen Pilze bilden Haustorien, die die pflanzliche Abwehr unterdrücken und den pflanzlichen Metabolismus umprogrammieren (VOEGELE & MENDGEN, 2003; BIEMELT & SONNENWALD, 2006). Die Pilze produzieren hydrolytische Enzyme, die die toxischen Pflanzenmetabolite spalten können. Darüber hinaus sind sie imstande die Andockstellen für die Wirtstoxine zu modifizieren oder die schon aufgenommenen Substanzen aus der Zelle auszuscheiden. Ferner, indem sie verstärkt Katalase, Peroxidase, Superoxiddismutase und Melanin bilden, sind die Pilze imstande die gegen sie gerichteten aktiven Sauerstoffspezies, abzufangen (DUFFY *et al.* 2003). Die Produktion

von Oxylipinen (Lipoxygenase und Linoleat-Diolsynthase), Glucosiden oder von den schon erwähnten zellwandabbauenden Enzymen trägt ebenso zur Schwächung des Wirtes bei und fördert die Ausbreitung der Erkrankung (FREEMAN & WARD, 2004). Darüber hinaus produzieren die Pilze Phytohormone, die in den pflanzlichen Entwicklungsablauf eingreifen bzw. eine wichtige Funktion für den Pilz selbst haben können (z.B. Gibberelline) und dadurch die Pflanze anfälliger gegenüber von Infektionen machen (TUDZYNSKI, 1997). Hierzu zählen Auxine (beteiligt an der Gallenbildung), Gibberelline (Induktion der Konidienkeimung und Hyphenverlängerung), Cytokinine (Gallenbildung, Transport der Nährstoffe zu den infizierten Stellen) oder Ethylen (Förderung der Konidienkeimung, Hyphenverzweigung und Appressorienbildung, z.B. bei *Colletotrichum*) (TUDZYNSKI, 1997). AUDENAERT *et al.* (2002) berichten über eine erhöhte Suszeptibilität von Pflanzen gegenüber den pathogenen Pilzen, wenn exogene Abscisinsäure (ABA) zugegeben wird, die ebenfalls von Mikroorganismen produziert werden kann.

Wird die Pflanze von biotrophen Pilzen infiziert, wird lediglich eine schwache Antwort der Pflanze auf den Befall registriert. In diesem Fall wird vermutet, dass der Pilz die Elicitoren (wie z.B. Chitin) maskieren bzw. degradieren kann. Durch den schnellen Nährstoffentzug in den infizierten Zellen wird aufgrund von mangelnder Assimilatenzufuhr die Expression von u.a. pflanzlichen Resistenzgenen unterdrückt. Ferner kann die Suppression der pflanzlichen Abwehr mittels sog. Supprescine (Glycopeptide) zustande kommen, die z.B. von dem nekrotrophen Pilz *Mycosphaerella pinodes* gebildet werden (HAHN & MENDGEN, 2001).

1.3 Strandhafer (*Ammophila arenaria* L. Link)

Der in der vorliegenden Arbeit als Modellpflanze verwendete Strandhafer (*Ammophila arenaria*) ist eine mehrjährige Graspflanze (*Poaceae*), heimisch in den sandigen Küstengebieten Nordeuropas (Nordsee, Ostsee, Atlantischer Ozean) sowie an den Küsten des Mittel- und Schwarzen Meeres, zwischen 30° und 63° nördlicher geographischer Breite. Obwohl *A. arenaria* zu den Glycophyten gehört, kann die Pflanze Salzkonzentrationen von 256 - 342 mM tolerieren (RUSSO *et al.* 1988; BUELL *et al.* 1995). Die Verbreitung von Strandhafer erfolgt über Sämlinge und vegetative Reproduktion, nicht selten nachdem die Rhizome, gespült vom Strand durch die Gezeiten, an neuen Orten regenerieren können (BUELL *et al.* 1995; APTEKAR & REJMANEK, 2000). Anfang des 20. Jh. wurde *A. arenaria* in den Westküsten der USA zur Dünenstabilisierung eingeführt. Heutzutage ist die Pflanze auch entlang australischer Küsten, in Neuseeland und in Südafrika zu finden (ROSS *et al.* 1988; VAN DER PUTTEN *et al.* 1988; HERTLING & LUBKE, 2000; LUBKE & HERTLING, 2001; GADGIL, 2002). Dort verursacht sie allerdings

Veränderungen der nativen Vegetationsflora und den Rückgang der Speziesdiversität (BUELL *et al.* 1995).

Bei der Bildung von Dünen wird dem Strandhafer eine sehr wichtige Funktion zugeschrieben. Die wachsenden Pflanzen leisten dem Wind Widerstand, was zur Verlangsamung der Sand-umlagerung und seiner Anhäufung führt. Die Dünenentstehung kann somit als Folge der Interaktionen zwischen Strandhafer und Wind angesehen werden (ROSS *et al.* 1988). Die Umlagerung von Sand hat gleichzeitig einen positiven Einfluss auf die Entwicklung und Vitalität von Strandhafer. Wird dieser Prozess gestoppt, degeneriert die Pflanze. Der Grund dafür ist, dass bei Erhalten der Strandhafervitalität Bodenmikroorganismen eine wichtige Funktion haben. Der Strandhafer besitzt eine AM, die der Pflanze Resistenzen gegen Bodennematoden und pathogene Pilze verleiht. Beweglicher Sand ist ärmer an Pathogenen als stabiler Sand oder Sandboden und fördert deswegen indirekt das Wachstum von *A. arenaria* (VAN DER PUTTEN *et al.* 1988; DE ROIJ-VAN DER GOES *et al.* 1995; DE ROIJ-VAN DER GOES; 1995; KULL, 1996; DE BOER *et al.* 1998).

Die Bodensalinität der Dünen liegt nach MARIKO *et al.* (1992) zwischen 0-50 mM NaCl. Die auf den vorderen Dünen wachsenden Pflanzen werden oft mit salzigem Meerwasser konfrontiert, was zu osmotischem, und im Endeffekt zu NaCl-Stress führen kann. Die Rhizome von z.B. *Ammophila arenaria* oder *Leymus mollis* (American Dunegrass) können zwar mehrere Tage im salzigem Seewasser überleben und sich auch regenerieren (APTEKAR & REJMANEK, 2000), werden die Pflanzen jedoch permanent salzigem Wasser ausgesetzt, bedeutet das für sie osmotischen Stress. Dieser äußert sich im Endeffekt durch Veränderungen des osmotischen Druckes und der Pflanzenelastizität, durch reduzierte Biomasse oder Keimungsfähigkeit der Samen (PAVLIK, 1988; BLITS & GALLAGHER, 1991; MARIKO *et al.* 1992; VOLKMAR *et al.* 1998; MUNNS, 2002).

Bisher ist wenig über die negativen Auswirkungen von Salzstress auf *A. arenaria* bekannt. Die bis jetzt durchgeführten Untersuchungen mit *A. arenaria* beschäftigen sich mit den Interaktionen zwischen dem Strandhafer und den bodenbürtigen Parasiten und Mikroorganismen (VAN DER PUTTEN *et al.* 1988; DE ROIJ-VAN DER GOES *et al.* 1995; DE ROIJ-VAN DER GOES; 1995; DE BOER *et al.* 1998) oder mit dem Einfluss von NaCl auf die Keimungsfähigkeit der Samen (MARIKO *et al.* 1992; SACHETI, 1998). Da die Salinität heutzutage ein Problem darstellt, das vor allem die landwirtschaftliche Produktion beeinträchtigt (SINGH & CHATRATH, 2001; YOKOI *et al.* 2002; WANGXIA *et al.* 2003; TESTER & BACIC, 2005), wurden viele Experimente durchgeführt, in denen der Einfluss von hohen Salinitäten auf die Pflanzen untersucht wurde sowie zu Versuchen, die die Toleranz der Pflanzen gegenüber dem biotischen Stress Verbessern sollten (NANJO *et al.* A 1999;

SAKAMOTO & MURATA, 2001; SATOH *et al.* 2002; KUMAR *et al.* 2004; SU & WU, 2004; MUNNS, 2005; YAMAGUCHI & BLUMWALD, 2005; NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; ZHAO *et al.* 2006) (vgl. auch 4.2.1). Als Modelnpflanzen fungierten dabei u.a. *A. thaliana*, Reis, Tabak, Karotte, Tomate, Gerste oder Weizen.

Da *A. arenaria*, wie die angebauten Getreidesorten (z.B. Weizen, Gerste, Roggen), zu den monokotyledonen Pflanzen gehört sowie aufgrund der Eigenschaften, die dem Strandhafer das Überleben in der dem Meereswasser ausgesetzten Umgebung ermöglichen, erschien *A. arenaria* als Modellorganismus besonders geeignet, um die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplanten Experimente durchzuführen (vgl. 1.8 und 2.3).

1.4 Stickstoffmetabolismus der Pflanzen

1.4.1 Veränderungen im Aminosäurenpool

Unter Salzstressbedingungen haben die Aminosäuren eine wichtige Funktion bei der Synthese von kompatiblen Soluten, zu denen u.a. Aminosäuren selbst (vorwiegend L-Prolin) sowie Aminosäurenderivate (z.B. Glycinbetain, Prolinbetain, Cholin-O-Sulfat, DMSP) zählen (NAIDU, 1998; RHODES, *et al.* 1999; HASEGAWA *et al.* 2000, YOKOI *et al.* 2002) (s. 1.1.2). Bei der Beurteilung der Auswirkungen von biotischem und abiotischem Stress auf Pflanzen werden bestimmte Aminosäuren als Marker diskutiert. Hierbei werden vor allem Arginin (Trocken-, Salz- und Säurestress), gamma-Aminobuttersäure (GABA; bei Temperatur-, Hitze- und Trockenstress sowie nach Insektenfrass), Prolin (Trocken-, Salz- und Temperaturstress) oder Phenylalanin (Verwundung durch z.B. Pathogenbefall) genannt (WAGNER, 2002). Der Aminosäurespiegel der Pflanze kann auch als Folge einer Besiedlung mit Pilzen Veränderungen erfahren (SOLOMON & OLIVER, 2001; WAGNER, 2002). Dies kann durch die Fähigkeit der Pilze zur Verwertung von unterschiedlichen N-Quellen (Ammonium, L-Glutamat, L-Glutamin, L-Asparagin oder L-Prolin) zustande kommen (MARZLUF, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch den Salzstress und / oder Pilzbesiedlung bedingte Produktion von osmoprotektiven Substanzen (L-Prolin) sowie Veränderungen in dem Aminosäurenpool des Strandhafers mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmt (vgl. 2.7.1 und 3.4).

1.4.2 Ferredoxin abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT)

L-Glutamin und L-Glutamat fungieren sowohl in der mikrobiellen als auch in der pflanzlichen Zelle als Stickstofflieferanten für die Biosynthese von den meisten N-haltigen Verbindungen (z.B. anderen Aminosäuren, Nucleotiden, Chlorophyllen, Polyaminen und Alkaloiden) (VAN DEN HEUVEL *et al.* 2004). Ein wichtiges Enzym, das für die Ammoniumassimilation bei den Pflanzen zuständig ist, ist die Ferredoxin abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT; = Glutamat-Synthase; EC 1.4.7.1). Fd-GOGAT nimmt eine Schlüsselfunktion im Glutaminsynthetase / Glutamatsynthase- Zyklus ein, wo L-Glutamat als NH_4^+ - Akzeptor und als Produkt der Assimilation fungiert (MIFLIN & LEA, 1977; DINCTURK & KNAFF, 2000; TOBIN & YAMAYA, 2001). Fd-GOGAT ist in den Mesophyllzellen vorhanden, wurde aber auch in den Wurzeln vorgefunden (LANCIEN *et al.* 2000). Vor allem jedoch ist das Enzym in den Blättern aktiv, wo es in die photorespiratorische N-Assimilation und in den Aminosäurenmetabolismus eingreift. Dem Licht wird dabei eine regulatorische Funktion zugesprochen (ESPOSITO *et al.* 2003 und 2005). Aus den zwei in der von Fd-GOGAT katalysierten Reaktion entstandenen Glutamatmolekülen fungiert eins als Substrat für die Glutaminsynthetase (GS; EC 6.3.1.2). Das restliche wird für den Transport oder für den weiteren Metabolismus zur Verfügung gestellt (TOBIN & YAMAYA, 2001). Darüber hinaus sind die Enzyme Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase für die Reassimilation von Ammonium notwendig, das während der Photorespiration entsteht (WEBER & FLÜGGE, 2002).

Um die L-Glutamatsynthese bei den salzgestressten bzw. von den Pilzen besiedelten *A. arenaria*- Pflanzen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die spezifische Aktivität des in die L-Glutamatbildung involvierten Enzyms Fd-GOGAT ermittelt (s. 2.7.3 und 3.7). Um den Einfluss von L-Glutamat auf die Biosynthese von anderen Aminosäuren (besonders L-Prolin, vgl. 1.4.3) zu untersuchen, fand gleichzeitig mittels HPLC die Gehaltsbestimmung von L-Glutamat in den pflanzlichen Extrakten statt (s. 2.7.1 und 2.7.3).

1.4.3 Prolin

1.4.3.1 Prolinmetabolismus

Wie unter 1.1.2 erwähnt gehört Prolin zu den wichtigsten osmoprotektiven Substanzen, die von den Pflanzen synthetisiert werden (PENG *et al.* 1996; NAKASHIMA *et al.* 1998; FABRO *et al.* 2004). Die Prolinbiosynthese in nicht gestressten Pflanzen erfolgt aus

Ornithin oder aus Glutamat. Im ersten Fall katalysiert eine Ornithin- δ -Aminotransferase (OAT; EC 2.6.1.13) eine Umsetzung von Ornithin und 2-Oxoglutarat zu Glutamat-Semialdehyd (GSA). Die Reaktion findet in den Mitochondrien statt. GSA kann entweder zu Glutamat umgesetzt oder in einer spontanen Reaktion zu Pyrrolin-5-Carboxylat umgewandelt werden (Abb. 1.2). Im letzten Fall katalysiert die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (P5CR; EC 1.5.1.2) die Reaktion von Pyrrolin-5-Carboxylat zu Prolin (HARE & CRESS, 1997). Wird die Pflanze jedoch osmotischem Stress oder N-limitierenden Bedingungen ausgesetzt, wird Prolin ausschließlich aus Glutamat gebildet (DELAUNEY & VERMA, 1993; KISHOR *et al.* 1995; HUA *et al.* 1997; STRIZHOV *et al.* 1997).

Bei den Bakterien wird die Umsetzung von L-Glutamat (L-Glu) zu Glutamat-Semialdehyd von zwei Enzymen durchgeführt. Eine Glutamyl-Kinase (GK; EC 2.7.2.11) setzt L-Glutamat zu L-Glutamyl-Phosphat um, das anschließend von der L-Glutamyl-Phosphat-Reduktase (GPR; EC 1.2.1.41) (genannt auch GSA-Dehydrogenase) zu GSA umgewandelt wird. GSA zerfällt spontan zu Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C), das von der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase zu L-Prolin umgesetzt wird (SMITH *et al.* 1984; SEDDON *et al.* 1989; KISHOR *et al.* 1995; SAVOURE *et al.* 1995; YOSHIBA *et al.*, 1997) (Abb. 1.2).

Bei den Pflanzen führt der erste Schritt der *de novo* Prolinbiosynthese vom L-Glutamat direkt zu Glutamat-Semialdehyd und wird von einem bifunktionellen Enzym Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS; EC 2.7.2.11 und EC 1.2.1.41) katalysiert (HU *et al.* 1992; KISHOR *et al.* 1995; SAVOURE *et al.* 1995; YOSHIBA *et al.* 1997; FUJITA *et al.* 1998 und 2003), das die Eigenschaften von sowohl GK als auch von GPR besitzt. Die übrige Katalyse vom GSA bis zum Prolin gleicht dem Syntheseweg bei den Bakterien (YOSHIBA *et al.* 1997) (Abb. 1.2). Der Ablauf dieser Reaktionen findet im Cytosol statt (HARE & CRESS, 1997). Die Gene, die für Ornithin- δ -Aminotransferase und P5CS kodieren, werden reziprok reguliert (VERMA, 1999).

EC 1.5.99.8) (Abb. 1.2) und die Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (P5CDH; EC 1.5.1.12) (nicht gezeigt), führen die Oxidation von L-Prolin über Pyrrolin-5-Carboxylat zum L-Glutamat durch (PENG *et al.* 1996; NAKASHIMA *et al.* 1998; NANJO *et al.* 1999; VERMA, 1999). Die Bakterien verwenden eine bifunktionelle Prolindehydrogenase, die Prolin direkt zu Glutamat oxidiert (PENG *et al.* 1996). Die Prolinakkumulation wird durch das Endprodukt der Biosynthese (Prolin) strikt kontrolliert (negative Rückkopplung), wobei seine Bildung und Degradierung im Gleichgewicht bleiben (HU *et al.* 1992; VERMA, 1999). Diese Kontrolle erfolgt auf der transkriptionellen Ebene, indem ein erhöhtes P5CS-Gehalt den Fluss von L-Glutamat bis P5C regulieren kann (HU *et al.* 1992) (vgl. 1.2.3.2).

1996 identifizierten und publizierten drei unabhängige Forschergruppen (KIYOSUE *et al.*, PENG *et al.* und VERBRUGGEN *et al.*) die Sequenzen der Prolindehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana*. Die Forscher stellten in ihren Untersuchungen eine auf den osmotischen Stress zurückgehende Runterregulation der Prolindehydrogenase bei *A. thaliana* fest. Somit ist die L-Prolinakkumulation unter Salzstressbedingungen nicht nur auf die erhöhte Prolinbiosynthese sondern auf die Inaktivierung des Prolinabbaus zurückzuführen. Bei der Stressentfernung ermittelten die Autoren wiederum eine Abnahme der P5CS-Transkripte, die von einer starken PDH-Expression und einer Reduktion des Prolingehaltes begleitet wurde (KIYOSUE *et al.* 1996; PENG *et al.* 1996 und VERBRUGGEN *et al.* 1996). PDH wird somit, gleich der P5CS, eine in den Prolinmetabolismus eingreifende regulatorische Funktion zugeschrieben (NAKASHIMA *et al.* 1998). Die PDH-Transkription ist gehemmt bei dem osmotischen, Salz- bzw. Wasserstress und wird während der Rehydrierung (Erholungsphase) aktiviert. Dadurch greift das Enzym in die Reduktion des Prolingehaltes ein (vgl. 3.9.2 und 4.7) (STINES *et al.* 1999; NANJO *et al.* 2003). Die reziproke Genregulation von P5CS und PDH stellt somit einen wichtigen Mechanismus dar, der den Prolingehalt in den pflanzlichen Zellen unter osmotischem Stress kontrolliert (PENG *et al.* 1996). Die Enzyme P5CS und PDH besitzen unter Stressbedingungen eine regulatorische Funktion und werden als geschwindigkeitsbestimmende („rate-limiting“) Faktoren bezeichnet (YOSHIBA *et al.* 1997; STINES *et al.* 1999; MAGGIO *et al.* 2002; RAYMOND & SMIRNOFF, 2002) (vgl. 1.2.3.3).

Um den Einfluss von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf den Prolinmetabolismus von *A. arenaria* zu testen erfolgten in der vorliegenden Arbeit u.a. Untersuchungen zur Prolinakkumulierung, -Synthese und -Abbau (vgl. 2.7.1; 2.7.4 und 2.8.2). Die spezifische Aktivität der P5CS, die in die Prolinbiosynthese eingreift, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels eines gekoppelten Assays durchgeführt (vgl. 2.7.4 und 3.8). Die Regulation der AaPDH-Expression während der Salzstresseinwirkung und nach einer Rehydrierung von

A. arenaria- Pflanzen erfolgte mittels einer semiquantitativen reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) (2.3.2 und 3.9.2).

1.4.3.2 Prolinfunktion

Prolin kann, wie unter 1.1.2 erwähnt, als Osmotikum fungieren. Die cytosolischen Prolingehalte sind jedoch oft nicht hoch genug, um dieser Aminosäure eine osmotische Funktion zu verleihen. In der Literatur wird oft diskutiert, dass speziell die für die Prolinbiosynthese und -Abbau zuständigen metabolischen Wege eine unentbehrliche Funktion unter Stressbedingungen haben. Damit wird auch Prolin eine regulatorische Funktion zugesprochen (HARE & CRESS, 1997; NANJO *et al.* 1997; HASEGAWA *et al.* 2000). Auf dem kurzen biosynthetischen Weg von Glutamat zu Prolin sind viele Reduktanten beteiligt. Die Oxidation von einem Prolinmolekül liefert 30 ATP und macht diese Aminosäure somit zu einer hervorragenden Energiequelle (HARE & CRESS, 1997). HASEGAWA *et al.* (2000) postulierten, dass bei der Salzstresseinwirkung u.a. zu einem Ungleichgewicht zwischen der Photosyntheserate und dem NADPH-Verbrauch im Calvinzyklus kommt und in Folge dessen zu Photoinhibition. Die Photoinhibition resultiert aus der „Überreduktion“ vom Photosystem II (PS), was zur Schädigung des 32 kDa D1-Proteins im PSII-Reaktionszentrum führt. Während der Prolinsynthese kann durch die Aktivität der NADPH-abhängigen Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase NADP⁺ entstehen. NADP⁺ kann den Pyridinnucleotidpool in der Zelle aufrechterhalten und somit zum Redoxgleichgewicht beitragen (HARE & CRESS, 1997). Weiterhin unterstützt die Abnahme des NADPH-Gehaltes den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg, der von NADP⁺ abhängig ist und von NADPH inhibiert wird. Die Autoren betonen auch eine wichtige Funktion von Prolin bei dem Kohlenstofffluss durch den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg. Die Enzyme (Dehydrogenasen), die in die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in die Ribose-6-Phosphat involviert sind, werden von NADPH inhibiert und damit durch das NADP⁺ / NADPH – Verhältnis reguliert. Eine vermehrte Reduktion des NADP-Pools wirkt sich ebenfalls auf das Schlüsselenzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase negativ aus. Darüber hinaus trägt der H⁺ - Ionen verbrauchende Prozess der Prolinbildung unter Stresseinwirkung zur Abnahme des intrazellulären pH-Wertes bei und beugt dadurch einer cytosolischen Acidose vor (HARE & CRESS, 1997).

Wird der Stress entfernt, folgt in den Mitochondrien ein schneller Prolinabbau zum Glutamat. Die Lokalisierung der Glutamat-Dehydrogenase im gleichen Kompartiment lässt vermuten, dass die Prolindegradierung über Glutamat zu 2-Oxoglutarat den Kohlenstoff für den Tricarbonsäurezyklus bereitstellt (HARE & CRESS, 1997). Ferner liefert ein schneller Abbau von Prolin während einer Erholungsphase Stickstoff aber auch Redoxäquivalente, die die oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien sowie die

ATP-Bildung unterstützen (RHODES *et al.* 1999, DI MARTINO *et al.* 2003). Die durch die Stresseinwirkung beeinträchtigte ATP-Synthese ist u.a. ein limitierender Photosynthesefaktor, der die Regenerierung von Ribulose-Biphosphat (RuBP) reduziert. Auch die Ribulose-Biphosphat-Carboxylase / Oxygenase (RubisCO) erfordert für ihre Aktivierung eine ATP-abhängige RubisCO-Aktivase, die unter ATP-Mangel inaktiv bleibt (HARE & CRESS, 1997) (vgl. 1.6.1). Eine wichtige Funktion von kompatiblen Soluten, u.a. auch von Prolin, besteht in der Stabilisierung von Proteinen, Enzymen und Membranen (Interaktionen mit den Phospholipiden) sowie im Abfangen von freien Radikalen (PENG *et al.* 1996; BOHNERT & SHEVELEVA, 1998; HASEGAWA *et al.* 2000). MAGGIO *et al.* (2002) zeigten, dass eine konstitutive Überproduktion von Prolin in den genetisch veränderten Hefezellen eine Proliferation von multiplen Vakuolen auslöste. Die Autoren schlugen damit eine Signalfunktion von Prolin bei der Vakuolisierung der Zellen vor, die vermutlich auch von den anderen kompatiblen Soluten ausgeübt wird. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei den salzgestressten Tabakzellen ermittelt, die nach der Stresseinwirkung mehrere Vakuolen bildeten (HASEGAWA *et al.* 2000).

Da das α -N-Atom von Prolin ein sekundäres Amin bildet (Iminosäure), kann Prolin nicht, wie die anderen Aminosäuren an den Transaminierungs- oder Decarboxylierungsreaktionen teilnehmen (HARE & CRESS, 1997). Nach DELAUNEY & VERMA (1993) gehört Prolin, unter Salzstressbedingungen, zu den am meisten verbreiteten Osmolyten nicht nur bei den Pflanzen, sondern auch bei den Eubakterien, Protozoen, marinen Vertebraten und Algen. Die Akkumulation von dieser Aminosäure wurde zum ersten Mal in welkendem *Lolium perenne*-Gewebe von KEMBLE & MCPHERSON (1954) ermittelt. Prolin wird aber auch als Antwort der Pflanzen auf andere Umweltstimuli, wie z.B. Hitze und Kälte, Toxizität durch die Schwermetalle, Pathogenbefall, Anaerobiose, Nährstoffmangel, Luftverschmutzung oder UV-Einstrahlung, akkumuliert (HARE & CRESS, 1997; NANJO *et al.* 1997; AYLIFFE *et al.* 2005). Um den Einfluss genannter Faktoren auf die zu untersuchenden *A. arenaria* auszuschließen, erfolgte die Kultivierung der Pflanzen unter konstanter Temperatur und konstanten Lichtverhältnissen (vgl. 2.1.2 und 2.1.3).

Prolin kann bei vielen Bakterien als einzige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle fungieren. *Saccharomyces cerevisiae* vermag ebenfalls mit Prolin als alleiniger N-Quelle, zu wachsen. Eine rapide Prolinoxidation liefert vielen Insekten die während des Fluges notwendige Energie (VERBRUGGEN *et al.* 1996).

In den transgenen Pflanzen kann eine erhöhte Prolinakkumulation durch die Überexpression von P5CS (KISHOR *et al.* 1995), einen Verlust der Aktivität der katabolischen Enzyme (NANJO *et al.* 1999) sowie die Aufhebung der Regulation durch die negative Rückkopplung (HONG *et al.* 2000) erreicht werden. Die Züchtung von

transgenen Pflanzen, die sich durch eine erhöhte Prolinbiosynthese auszeichnen, ist nach NANJO *et al.* (2003) jedoch kontrovers. Es wurde gezeigt, dass eine exogene Prolingabe und eine Überproduktion von Prolin eine toxische Wirkung auf die pflanzlichen Zellen ausüben (HELLMANN *et al.* 2000; MANI *et al.* 2002; DEUSCHLE *et al.* 2001).

1.5 Veränderungen im Zucker- und Zuckeralkoholpool

Die im Calvinzyklus gebildeten Assimilate dienen vor allem der Versorgung der Pflanze mit Energie (Glucose, Stärke, Fructane, ATP). Zucker und Zuckeralkohole (z.B. Saccharose, Mannitol) werden in den Pflanzen aber auch als Antwort auf einen biotischen (Besiedlung durch Mikroorganismen) oder abiotischen Stress (z.B. Salzstress) gebildet (HELDT, 1996) und fungieren gleichzeitig als Depot von Reduktionskraft (LEWIS & SMITH, 1967). Als im Cytoplasma gespeicherte kompatible Solute gleichen sie den osmotischen Druck aus, der durch die Kompartimentierung von toxischen Na^+ - bzw. Cl^- - Ionen in der Vakuole entsteht (VERMA, 1999; YOKOI *et al.* 2002). Eine besondere Rolle von Kohlenhydraten in den Interaktionen zwischen Pflanze und Pilz ist die Bildung von Reservopolysacchariden der Pflanzen und von Zuckeralkoholen, die eine wichtige Funktion im Pilzmyzel einnehmen (WAGNER, 2002).

Der Fluss der Assimilate in der Pflanze wird durch Phytohormone gesteuert (Gibberelline, Cytokinine oder Auxine), die die Synthese, den Abbau und die Verteilung von Zuckern regulieren. Die Zucker indessen nehmen einen Einfluss auf den Metabolismus und / oder den Transport der Signalmoleküle, wie z.B. Gibberelline oder Abscisinsäure (ABA) (GIBSON, 2004). Als Beispiel kann die Invertase genannt werden, deren Regulation eine essentielle Verbindung zwischen den durch die Phytohormone gesteuerten molekularen Mechanismen und dem primären Metabolismus darstellt (STURM, 1999; ROITSCH *et al.* 2003). Die Invertase, die Saccharose zu Glucose und Fructose spaltet, hat eine bedeutende Funktion in der Saccharosepartitionierung und im Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Ihre Aktivität wird von internen und von Umweltfaktoren beeinflusst, wie z.B. Kohlenhydraten, Cytokinen, Gibberellinen, Licht, Temperatur, Verwundung, Pathogenbefall sowie vom Wasserstatus der Pflanze. Die Induktion der Invertase wird wiederum mit der ABA und dem Glucosegehalt in Zusammenhang gebracht (TROUVERIE *et al.* 2004). Wird Saccharose beim osmotischen Stress in der Pflanze akkumuliert, kann sie unter Stresseinwirkung aber auch während der Erholungsphase (Rehydrierung) abgebaut werden und liefert damit die notwendige Energie für die Wiederherstellung von den metabolischen Aktivitäten sowie für das Aufheben der stressbedingten Schäden (HARE *et al.* 1998; WHITTAKER *et al.* 2004). Auch die plastidäre Stärke wird unter Stressbedingungen abgebaut und trägt dadurch zur Verstärkung des Saccharosepools bei (HARE *et al.* 1998). Bei der Untersuchung von zwei verschiedenen kältegestressten *A.*

thaliana-Ecotypen (Col-0 und C24) fanden KLOTKE *et al.* (2004) eine Akkumulierung von Hexosen, die auf eine erhöhte Invertaseaktivität schließen lässt. Die Autoren schlugen vor, dass der Zunahme von den Hexosen ein verstärkter Kohlenstofffluss in die Glycolyse zugrunde liegt (Energiegewinn).

In Bezug auf die Einwirkung von osmotischem und Salzstress auf die Pflanzen werden die schon genannten Zuckeralkohole diskutiert. Zuckeralkohole (auch Polyole) stellen chemisch reduzierte Ketose- oder Aldoseformen dar (STOOP *et al.* 1996). Die zyklischen Formen werden als Zyklitole bezeichnet (POPP & SMIRNOFF, 1995). BOHNERT *et al.* (1995) sehen die Funktion der Polyole einerseits in der osmotischen Anpassung. Dabei fungieren die Polyole als Osmolyte und schützen die zellulären Strukturen, wie Membranen, Proteinkomplexe und Enzyme (z.B. durch das Abfangen von freien Radikalen) (vgl. 1.1.2). Andererseits haben die Polyole eine osmoprotektive Funktion, indem sie als reduzierte Zucker einen Kohlenstoffspeicher unter Stresseinwirkung darstellen (POPP & SMIRNOFF, 1995; BOHNERT *et al.* 1995). POPP & SMIRNOFF (1995) diskutieren die Salz- und Trockenstress-bedingte Akkumulierung von Polyolen in den Pflanzen, wobei die Konzentrationen bei verschiedenen Gattungen auch unterschiedlich sein können. Die im salinen Wasser wachsenden Mangrovearten *Aegniceras corniculatum* und *Laguncularia racemosa* produzieren vorwiegend Mannitol, *Plantago*-Spezies bilden dagegen Sorbitol. Die dem osmotischen Stress ausgesetzte Taubenerbse (*Cajanus cajan*), *Mesembryanthemum crystallinum* und *Sesbania aculeata* synthetisieren den zyklischen Polyol Pinitol (POPP & SMIRNOFF, 1995; KARAKAS *et al.* 1997). Auch viele Algen speichern die Assimilate in der Polyolform (Glycerol, Mannitol und Sorbitol). Sie reagieren auf die veränderten osmotischen Bedingungen, indem sie die Konzentrationen der Polyole in den Zellen variieren. Die einzellige Alge *Dunaliella* produziert unter Salzstressbedingungen z.B. vermehrt Mengen an Glycerol. Wird die Salinität reduziert, wird Glycerol zu Stärke umgebaut (POPP & SMIRNOFF, 1995).

Mannitol gehört zu den am häufigsten vorkommenden Polyolen in der Natur. Bei den Oleaceae, Apiaceae oder Rubiaceae macht er einen großen Teil der löslichen Kohlenhydratfraktion aus. Dieser Polyol wird ebenfalls von Brassicaceae, Cucurbitaceae und Fabaceae gebildet. In Sellerie (*Apium graveolens*) beispielsweise werden 50 % des fixierten CO₂ zum Mannitol umgesetzt, wobei die andere Hälfte in die Saccharosesynthese einbezogen wird. Zuckeralkohole sind stärker reduziert als die anderen Kohlenhydrate und speichern damit auch mehr Energie. Darüber hinaus zeigen Mannitol-produzierende Pflanzen eine erhöhte Salztoleranz, die auf die osmolytische und osmoprotektive Funktion von Mannitol zurückzuführen ist (STOOP *et al.* 1996). Die wichtigen Funktionen von Mannitol, die auf seine Speicher-, Reduktionskraft-,

antioxidative und osmoregulative Eigenschaften zurückgehen, werden von IWAMOTO & SHIRAIWA (2005) für Algen diskutiert.

Ononitol und Pinitol haben ebenfalls eine wichtige Funktion unter Wasserstressbedingungen. Bei dem Halophyten *Mesembryanthemum crystallinum*, der sich durch eine hohe Toleranz gegen hohen Salinitäten, Trockenheit und Kälte auszeichnet, wird *myo*-Inositol zu D-Ononitol methyliert, das weiterhin zu D-Pinitol epimerisiert wird. Letzteres wird in den Zellen als die Antwort auf den Stress akkumuliert (ISHITANI *et al.* 1996). *myo*-Inositol wird ebenfalls von den Kiefern und Erdbeeren bei Trockenstress gebildet (KARAKAS *et al.* 1997).

Einige der Gene, die für die osmoprotektiven Kohlenhydrate kodieren, wurden erfolgreich in den transgenen Pflanzen überexprimiert und erhöhten deutlich ihre Salztoleranz. Ein bakterielles Gen, das für die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase kodiert, wurde in die Tabakpflanzen eingeführt, wo es zur Mannitolakkumulierung und einer erhöhten Salztoleranz beitrug (TARCZYNSKI *et al.* 1993). KARAKAS *et al.* (1997) stellten jedoch in ähnlichen Versuchen mit *Nicotiana tabacum* fest, dass die gestressten transgenen Tabakpflanzen kleiner waren als die Kontrollen. Die Autoren schlugen vor, dass die ermittelte Salztoleranz auf das langsame Pflanzenwachstum und nicht auf die erhöhte Mannitolakkumulierung zurückzuführen ist. Das langsame Wachstum würde der Pflanze ermöglichen, die toxischen Ionen mit gleicher Rate in der Vakuole einzuschließen, mit der sie auch aus der Umgebung aufgenommen werden. Mannitol könnte demnach eine andere Funktion als Osmolyt in Stresstoleranz haben (ABEBE *et al.* 2003).

Die Überexpression von den beiden in die Trehalosebildung involvierten Enzyme (Trehalose-6-Phosphat-Synthase und Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase) in transgenen Pflanzen führte zu einer verbesserten Trockentoleranz, ohne die Trehalosekonzentrationen signifikant zu erhöhen (KOSMAS *et al.* 2005). Ferner wurden z.B. bei den transgenen Tabak- und Reispflanzen, die Trehalose überexprimierten, ebenfalls eine gesteigerte Trocken- und Salztoleranz (POPP & SMIRNOFF, 1995; YEO, 1998), eine erhöhte Photosyntheserate sowie geringe photooxidative Schäden festgestellt (WANG *et al.* 2003).

Die Partitionierung von Kohlenhydraten in der Pflanze stellt einen Prozess dar, dessen Gleichgewicht durch äußere Einflüsse (Pathogenbefall oder biotischer Stress) beeinträchtigt werden kann (ROITSCH *et al.* 2003). Die Verteilung der von der Pflanze synthetisierten organischen Substanzen (Assimilate) von den Produktionsorten (*source*) zu den Verbrauchsorten (*sink*) erfolgt überwiegend über die Siebelemente des Phloems. Die Haupttransportmetabolite sind nicht nur reduzierte Zucker, wie Saccharose (STURM, 1999; TRUERNIT, 2001) aber auch Mannitol (STOOP *et al.* 1996). Daneben findet man im

Siebröhrensaft auch Aminosäuren, Nucleotide, Vitamine, organische Säuren und Phytohormone. Reduzierte Zucker, wie z.B. Glucose oder Fructose werden nicht transloziert. Als *source* fungieren z.B. photosynthetisierende, ausgewachsene Blätter oder aber Speicherorgane (z.B. Knollen, Zwiebeln oder Rüben beim Austrieb). Als *sink* dienen alle wachsenden Pflanzenteile, wie z.B. Spitzenmeristeme, Cambium, junge wachsende Blätter oder Früchte (STRASSBURGER, 2002; BIEMELT & SONNENWALD, 2006). Die Phloembeladung kann entweder apoplastisch (bei den vorwiegend Saccharose als Hauptzucker verwendenden Pflanzen) bzw. symplastisch (bei den Pflanzen, die neben Saccharose nennenswerte Mengen von Oligosacchariden der Raffinosefamilie transportieren) erfolgen (ISAAC, 1992; STRASSBURGER, 2002). Auch Zuckeralkohole (z.B. Mannitol, Sorbitol oder *myo*-Inositol) kommen in vielen Pflanzen vor und sind als ein Bestandteil des pflanzlichen Kohlenhydratpools anzusehen (POPP & SMIRNOFF, 1995). Zucker wie Saccharose, Glucose und Fructose haben eine essentielle Funktion im pflanzlichen Metabolismus. Diese Zucker werden für den intermediären- und respiratorischen Metabolismus verwendet. Ferner stellen sie Substrate für komplexe Kohlenhydrate, wie Stärke oder Cellulose, dar. Darüber hinaus bilden sie die Gerüste für die Biosynthese von Amino- und Fettsäuren sowie für viele andere von der Pflanze gebildete Substanzen. Zucker haben auch eine wichtige regulatorische Funktion. Ähnlich wie Hormone üben sie einen Einfluss auf die Genexpression und die Aktivitäten von vielen Enzymen aus (SMEEKENS, 2000).

Wird die Pflanze von Pathogenen befallen haben die Kohlenhydrate eine wichtige Funktion bei der Antwort der Pflanze auf den Stress und damit bei der Signalübertragung. Die Signalfunktion der Hexosen äußert sich in der Induktion der pflanzlichen Abwehrreaktion, Reduktion der Photosynthese und in der Synthese von Phytoalexinen (BIEMELT & SONNENWALD, 2006). Dabei werden PR-Proteine, strukturelle Zellwandproteine (HRGPs; s. 4.1.4) und hydrolytische Enzyme (wie z.B. Invertase) aktiviert. Glucose z.B. übt u.a. eine regulatorische Funktion auf den Metabolismus aus. HARE *et al.* (1998) postulierten dabei, dass nicht der Hexosengehalt *per se* eine regulatorische Funktion hat, sondern die Phosphorylierung der Hexokinasen selbst. Glucose ist auch bei der Entstehung der pflanzlichen hypersensitiven Antwort beteiligt, was der Pflanze eine Reaktion auf den Pathogenbefall ermöglicht. Die Umsetzung von Glucose u.a. zur ATP-Gewinnung erfolgt nicht nur über die Glycolyse sondern über den energetisch ungünstigeren oxidativen Pentose-Phosphat-Weg. Über diesen Biosyntheseweg werden u.a. die phenolischen Metabolite gebildet, die zur Pathogenabwehr beitragen (ISAAC, 1992; WAGNER, 2002) (vgl. 1.2). Ein erhöhter Saccharosegehalt fördert, besonders während einer inkompatiblen Reaktion zwischen

dem Pilz und Pflanze, eine schnelle Mobilisierung von HRGPs. Darüber hinaus trägt er zur Bildung von Lignin und ligninhaltigen Substanzen (z.B. Diferulaten) bei, die die Stabilität der Zellwand erhöhen (BISHOP *et al.* 2002).

Die Signalfunktion der Hexosen wird von den biotrophen Pilzen erfolgreich unterdrückt, indem eine effiziente Hexoseaufnahme in die Hyphen oder die Bildung von pilzlichen Effektoren (Suppressoren) stattfindet (BIEMELT & SONNENWALD, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels HPLC die Veränderungen im Zucker- und Polyolpool bestimmt, die bei Strandhafer auf den Salzstress und / oder die Pilzbesiedlung zurückzuführen sind (s. 2.7.2 und 3.6).

1.6 Biomasse

1.6.1 Pflanzliche Biomasse unter Salzstresseinwirkung

Die Biomasse ist ein wichtiger Faktor, der eine Information über den Zustand eines Organismus in Abhängigkeit von sich ändernden Umweltbedingungen liefert. Unter der Einwirkung von z.B. Salzstress fließt ein großer Teil der Energie, die bei den biosynthetischen Prozessen verbraucht wird, in die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase (z.B. durch die Kompartimentierung von toxischen Ionen, Salzausscheidung) und in die Bildung von organischen Soluten (VOLKMAR *et al.* 1998; ZHU, 2002). Die genannten Faktoren führen zur Beeinträchtigung des Wachstums und somit zur Reduktion der Biomasse (MÜHLING & LÄUCHLI, 2002; MUNNS, 2002). Eine Relation zwischen der Salinität der Umgebung und der Biomasse von salzgestressten Pflanzen ist in der Abbildung 1.3 dargestellt.

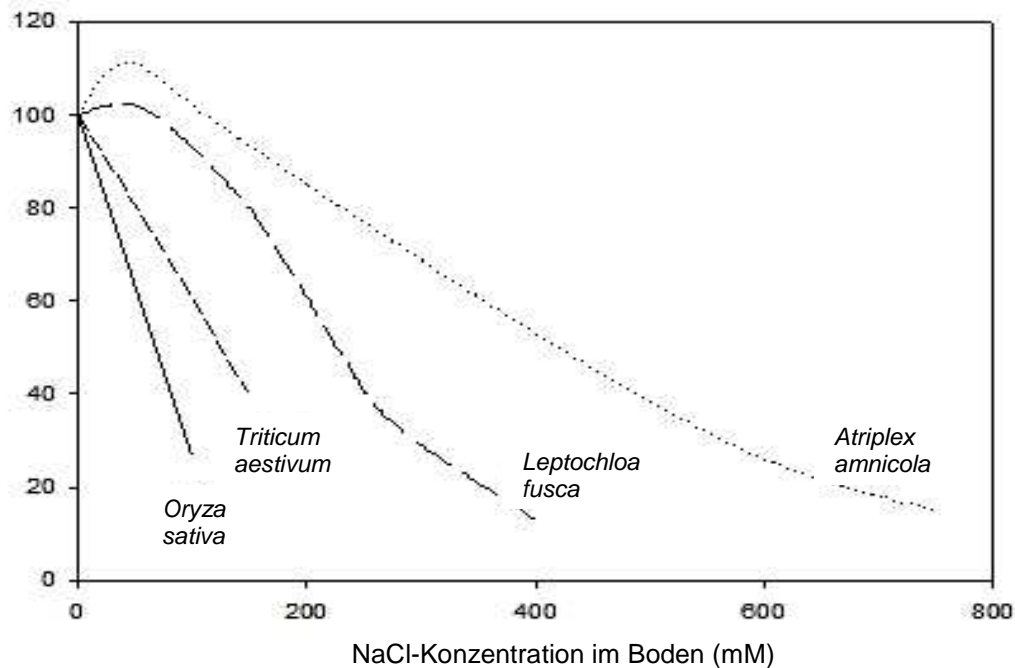


Abb. 1.3 Relative Biomasse ([%]; Y-Achse) von vier diversen Pflanzenspezies in Abhängigkeit von der Bodensalinität (mM). Dargestellt sind die wichtigen Anbaupflanzen *Oryza sativa* (Reis; salzsensitiv) und *Triticum aestivum* (Weizen; am meisten tolerant unter den Anbaupflanzen) sowie zwei Halophyten: *Atriplex amnicola* (saltbush; Meldegewächse) und *Leptochloa fusca* (kallar grass; braunes Dünngras), die in Australien und Asien bei der Bepflanzung von salinen Gebieten eingesetzt werden.

Quelle: <http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>.

Um den Einfluss von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf die *A. arenaria*- Pflanzen zu untersuchen, wurde nach Ablauf der Experimente das Biotrockengewicht des Strandhafers ermittelt (s. 2.4 und 3.2.2).

Pflanzen reagieren auf den Salzstress in zwei Phasen (MUNNS, 1993; VOLKMAR *et al.* 1998; MÜHLING & LÄUCHLI, 2002). In der ersten Phase kommt es zu einer Wachstumsreduktion, die auf eine osmotische Wirkung von Salz auf die Wurzeln und somit auf eine verringerte Verfügbarkeit von Wasser zurückzuführen ist. Die zweite Phase zeichnet sich durch die Anreicherung von toxischen Natriumionen, besonders in vollständig entwickelten Blättern, aus (MÜHLING & LÄUCHLI, 2002; MUNNS, 2005). In den ersten Minuten nach der Salzstressapplikation erscheint eine kurzlebige und nicht auf den Salzstress zurückzuführende Verminderung der Expansionsrate der Blätter und der Wurzeln. Sie ist allein auf die veränderten Wasserverhältnisse im Boden zu beziehen (PASSIOURA & MUNNS, 2000). Dauert der Stress über Tage an, bleibt das Wachstum weiter herabgesetzt, wobei die Blätter mehr betroffen sind als die Wurzeln. Dieser Prozess ist nach MUNNS (2000 und 2005) vermutlich auf die hormonelle Kontrolle (z.B. von Abscisinsäure; ABA) zurückzuführen. Ferner erreichen die Na^+ - und Cl^- -

Konzentrationen in den wachsenden Zellen zu diesem Zeitpunkt kaum 100 mM und sind somit nicht toxisch. Dies wurde z.B. für *Atriplex amnicola* berichtet, wo bei einem äußeren NaCl-Gehalt von 400 mM die NaCl-Konzentrationen in den Wurzeln lediglich 40 mM betrug (MUNNS, 2002).

Die Aufnahme von Salz in die Pflanze kann als das Produkt des Transpirationsstroms angesehen werden, der zur Erhaltung des pflanzlichen Wasserstatus erforderlich ist. Eine unregulierte Transpiration resultiert somit in der Akkumulation von toxischen Ionen in der Pflanze. Als direkte Antwort auf den Salzstress werden die Stomata geschlossen (HASEGAWA *et al.* 2000; ROELFSEMA & HEDRICH, 2005).

In der zweiten Phase, die besonders für die salzsensitiven Spezies (z.B. Mais oder Reis) gilt, zeigen sich schon nach wenigen Tagen die ersten Symptome der Schädigung. Da diese Pflanzen keine Fähigkeit besitzen, die toxischen Ionen in der Vakuole zu kompartimentieren, steigen die Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen in den Zellen an (s. 1.1.2). Als Folge werden Enzyme inhibiert und die Zellen aufgrund von geschädigten Zellwänden dehydriert. Die äußere Schädigung der Pflanze wird in den Vergilbungen und dem Absterben von älteren Blättern sichtbar (MUNNS, 2002). Können die abgestorbenen Blätter nicht durch das schnelle Nachwachsen von neuen Blättern ersetzt werden, stirbt die ganze Pflanze ab (VOLKMAR *et al.* 1998).

Bei den osmotisch gestressten Pflanzen wirken sich die Beeinträchtigung der Expansionsrate der Blätter, der Blattoberfläche und ihrer Lebensdauer sowie das Schließen von Stomata ebenfalls negativ auf den Prozess der Photosynthese aus. Das Schließen von Stomata führt automatisch zur Verminderung der CO_2 -Assimilationsrate sowie zur Inhibition der Chlorophyllbildung und beeinflusst somit den Prozess der Photosynthese (CHERNYAD'EV, 2005). Die auf den Wasserstress zurückzuführenden Veränderungen der Ionenkonzentrationen (z.B. Mg^{2+}) im Stroma wirken sich durch die Aufhebung der regulatorischen Ionenfunktion negativ auf die Aktivität von Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RubisCO) aus. Die RubisCO-Aktivität wird durch die verringerte CO_2 -Fixierungsrate negativ beeinflusst. Als direkte Folge verändert sich der Metabolitenpool im Calvinzyklus, was einen negativen Einfluss auf die Saccharose- und Stärkebildung hat (LAWLOR, 1995). DI MARTINO *et al.* (2003) beobachteten bei dem über 27 Tage in 0,17 M NaCl kultivierten Spinat, im Vergleich zur Kontrolle, eine Abnahme des Chlorophyllgehaltes und der RubisCO-Aktivität um 50 %. In Folge der genannten Veränderungen werden der Pflanze weniger Assimilate zur Verfügung gestellt, was in reduzierter Energieproduktion und anschließend in einer geringen Biomasseproduktion resultiert (ISHIKAWA *et al.* 1991; VOLKMAR *et al.* 1998; SINGH & CHATRATH, 2001; ZHU, 2001).

1.6.2 Pflanzliche Biomasse unter Pilzbesiedlung

Pilze gehören zu den heterotrophen Organismen und müssen die organischen Substanzen von den externen Substraten in ihrer Umgebung beziehen. Sie können dabei eine saprotrophe, nekrotrophe bzw. biotrophe Lebensweise führen. Zu den phytopathogenen Pilzen zählen biotrophe Pilze, die ihre Nährstoffe den lebenden Zellen ihrer Wirtspflanze entziehen. Nekrotrophe Pflanzenpathogene dagegen verwenden Toxine und degradierende Enzyme, um die Wirtszellen abzutöten (ISAAC, 1992; WAGNER, 2002). Das Pathogen fungiert dabei als ein metabolischer *sink*, der die Ressourcen der Pflanze ausschöpft (vgl. 4.5.2). ISAAC (1992) berichtet von Versuchen, bei denen die infizierten Pflanzen eine erhöhte Respirationsrate aufwiesen, die auf das Vorhandensein von atmendem Myzelium im pflanzlichen Gewebe zurückzuführen war. Ferner kann bei den besiedelten Pflanzen die Photosyntheserate reduziert werden, die als Folge der direkten Chloroplastenzerstörung (Auflösung der strukturellen Integrität) bzw. einer geänderten CO₂-Aufnahmerate zu sehen ist. Die Pilzinfektionen bei den Pflanzen können den Elektronenfluss von Wasser zu NADP beeinträchtigen, die CO₂-Assimilation inhibieren (Reduktion der Saccharosesynthese) oder auch den zyklischen Elektronentransport blockieren. Der Pilzbefall stellt einen starken *sink* für die Nährstoffe dar und ist daher als eine Konkurrenz für die natürlichen *sinks* in der Pflanze (Wurzeln, Blätter, Blüten und Früchte) anzusehen (WAGNER, 2002). Das Kohlenhydratgleichgewicht der Pflanze wird zu Gunsten des Pilzes verändert und zeigt sich in einer verstärkten Translokation der Assimilate in seine Richtung (ISAAC, 1992). Der Wassertransport kann durch den Befall und die Zerstörung der Leitbündel beeinträchtigt werden (nekrotrophe Pilze), was anschließend zum Welken führt (NARAYANASAMY, 1997). Weitere Prozesse (z.B. Bildung von Toxinen oder phytotoxischen Enzymen), die zur Verringerung der pflanzlichen Biomasse bei einem Pilzbefall führen können, wurden ausführlich unter 1.2 beschrieben.

Die möglichen Mechanismen, die bei den von Endophyten besiedelten Pflanzen zur Steigerung der Biomasse bzw. zur Erhöhung von Resistenzen führen sind nicht vollständig aufgeklärt. Für *Epichloë* z.B. wurde nachgewiesen, dass der Pilz Phytohormone und Enzyme produziert, die den Kohlenhydratfluss in der Pflanze verändern (PAN & CLAY, 2004) und damit einen möglichen Mechanismus zur Erhöhung der Biomasse darstellen könnte (CHEPLIK, 2004). Durch die Bildung von Sekundärmetaboliten können die Endophyten eine chemische Kontrolle und damit einen selektiven ökologischen Druck auf die endophytische Gemeinschaft in der Pflanze ausüben (SCHULZ *et al.* 2002; MUCCIARELLI *et al.* 2003). Ferner können sie die Abwehrmechanismen des Wirtes gegen potentielle Pathogene induzieren, seine

metabolische Aktivität erhöhen, zur induzierten Resistenz beitragen und die Versorgung der Pflanze aus der Rhizosphäre verbessern (SCHULZ & BOYLE, 2005). ERNST *et al.* (2003) vermuten, dass die Steigerung der Biomasse bei *Phragmites australis* durch *Stagonospora* spp. auf die Mykorrhiza-ähnliche Wirkung dieses Pilzes zurückzuführen ist. Die *Lolium perenne* und *Festuca arundinacea* besiedelnden Endophyten synthetisieren Alkaloide (z.B. Loline oder Peramine), die die Wirtspflanze gegen Herbivoren schützen (BACON & HILL, 1996; FAETH, 2002; LEHTONEN *et al.* 2005). Darüber hinaus zeichnen sich die infizierten Pflanzen durch eine erhöhte Photosyntheserate, schnelle osmotische Anpassung, effiziente Ausnutzung von Bodenstickstoff sowie eine bessere Aufnahme von P, K, Ca und Mg aus dem Boden aus. Die genannten Faktoren tragen im Endeffekt zur erhöhten Biomasse bei den Gräsern bei (RAHMAN & SAIGA, 2005). Die Endophyten können auch zu einer erhöhten Toleranz gegen Bodenhitze (65 °C) führen, was bei *Dichanthelium lanuginosum*-Pflanzen festgestellt wurde, die mit dem endophytischen Pilz *Curvularia* sp. inokuliert wurden (REDMAN *et al.* 2002).

Viele Studien belegen, dass auch die Mykorrhizapilze das Wachstum ihrer Wirte unter Stressbedingungen (z.B. Salinität) verbessern (FENG *et al.* 2002; CHO *et al.* 2006), zur Resistenz gegen Krankheiten führen sowie die photosynthetische Kapazität begünstigen können (BRUNDRETT, 2004). Bei den Untersuchungen zur verbesserten Salztoleranz von *Zea mays* gegen den Salzstress zeigten die mit dem arbuskuläre-Mykorrhiza- (AM)- Pilz *Glomus mosseae* inokulierten Pflanzen u.a. erhöhte Wurzel- und Triebgewichte, im Vergleich zu den nicht mykorrhizierten Individuen (FENG *et al.* 2002). Ferner wurde von verbessertem Wachstum bei *Acacia auriculiformis* berichtet, die mit *Glomus fasciculatum* oder *G. macrocarpum* inokuliert wurde (GIRI *et al.* 2003). RUIZ-LOZANO *et al.* (1996) postulierten, dass die Steigerung der Biomasse bei den AM-Pflanzen auf physiologische Prozesse zurückzuführen ist, wie z.B. eine erhöhte CO₂-Austausch- und Transpirationsrate sowie eine effizientere Wassernutzung. Eine wichtige Funktion wird dabei den in den Wurzeln gebildeten wachstumsregulierenden Substanzen zugesprochen, die den pflanzlichen Metabolismus modulieren. Die AM-Mykorrhiza stellt durch den Transfer von Wasser aus dem Boden, via Pilzhyphen und weiter an die Wirtspflanze, eine bessere Anpassung an den osmotischen Stress dar. Bei den mykorrhizierten Pflanzen können die ermittelten erhöhten Aktivitäten der Nitratreduktase (NO₃⁻-Assimilation) sowie der Superoxid-Dismutase (Abfangen von radikalen Sauerstoffspezies) ebenfalls zur Milderung der Folgen von osmotischem Stress beitragen (RUIZ-LOZANO, 2003; PINIOR *et al.* 2005). Es wurde auch nachgewiesen, dass in den Arbuskeln-haltigen Zellen der mykorrhizierten Pflanzen die Gene hochreguliert werden, die für die Aquaporine kodieren (vgl.1.1.1). Dadurch kommt es zu einem verbesserten

Wassertransport zwischen den Symbiosepartnern (PORCEL *et al.* 2006). Der AM-Pilz *Glomus versiforme* stimulierte signifikant das Wachstum und die Biomasse von wassergestressten *Citrus tangerine*- Pflanzen. Die mykorrhizierten Pflanzen wiesen erhöhte Konzentrationen an löslichen Kohlenhydraten sowie K^+ - und Ca^{+2} -Ionen auf. Sie zeichneten sich gegenüber den Kontrollen durch eine erhöhte Transpirations- und Photosyntheserate, einen höheren relativen Wassergehalt (RWC) und einen gesteigerten Transpirationskoeffizienten von den Stomata aus. Die Untersuchungen haben auch gezeigt, dass die verbesserte Toleranz der Zitruspflanzen gegen die Trockenheit nicht auf Prolin sondern auf die Akkumulation von nicht-strukturellen Kohlenhydraten (Stärke, einfache Zucker, Pectin, Fructane) sowie Mg^{+2} -, Ca^{+2} - und K^+ - Ionen zurückzuführen ist (WU & XIA, 2006).

Das Phänomen der wachstumsfördernden Wirkung, der erhöhten Krankheits- bzw. Trockenheitsresistenz, die der Wirtspflanze verliehen werden kann, gilt auch für pathogene Pilze. Allerdings ist dieses im Rahmen der sog. induzierten Resistenz zu betrachten (STEINER & SCHÖNBECK, 1997) (vgl. 1.2). Andererseits kann es bei Befall mit pathogenen Mikroorganismen zu einem geringen Biomassezuwachs bis hin zum Absterben der Pflanze kommen, wie das z.B. für den Pilz *Gaeumannomyces graminis* („the take-all fungus“) bekannt ist (FREEMAN & WARD, 2004) (vgl. 4.1.4).

Um die wichtige Frage beantworten zu können, ob die endophytischen Pilze den Einfluss von Salzstress auf *A. arenaria*- Pflanzen mildern können, wurde in der vorliegenden Arbeit u.a. untersucht, welchen Einfluss die Kolonisierung der salzgestressten Pflanzen mit den endophytischen bzw. pathogenen Pilzen auf die Biomasse von *A. arenaria* nimmt (s. 2.3 B und C).

1.6.3 Pilzbiomasse unter Salzstresseinwirkung

Das Wachstum der Pilze unter Wasserstressbedingungen (negatives Wasserpotential) erfordert die Aufrechterhaltung von Turgordruck, der als ein essentieller Teil des Wasserpotentials in der Zelle gilt (MAGAN, 1997; vgl. 1.1.3). Ein kontinuierlicher Wasserinflux in die Zelle ist für das Hyphenwachstum unentbehrlich. Der Zellturgor in den Hyphen ermöglicht wiederum den Pilzen in Böden sowie im pflanzlichen und tierischen Gewebe zu expandieren (KUEHN *et al.* 1998; DAVIS *et al.* 2000). Aufgrund dessen, dass alle zellulären Prozesse in einer Wasserlösung stattfinden, ist es für einen Mikroorganismus von zentraler Bedeutung über Anpassungsmechanismen zu verfügen, die ihm das Wachstum und die Reproduktion unter sich stets verändernden Umweltbedingungen ermöglichen (BLOMBERG & ADLER, 1993; MAGAN, 1997).

MAGER & VARELA (1993) postulierten, dass die Erhöhung der externen Osmolarität den Ionengradienten (Na^+ , K^+ , H^+) an der Membran stören und damit zum Turgorverlust führen. Das löst in den Zellen komplexe Kaskaden und Mechanismen aus, zu denen Aktivierung von Proteinkinasen, Modifikation der Enzyme sowie Veränderungen der Genexpression gehören. Als Antwort auf die Abnahme des externen Wasserpotentials, werden durch die Zellmembran anorganische Ionen (K^+ , Na^+) aufgenommen bzw. ausgeschieden sowie osmoprotektive Substanzen synthetisiert, deren Aufgabe u.a. in der Aufrechterhaltung der Turgidität liegt (JENNINGS & BURKE, 1990; BLOMBERG & ADLER, 1993; MAGAN, 1997; KUEHN *et al.* 1998; RAMIREZ *et al.* 2004).

Zu den am meisten von den Pilzen produzierten kompatiblen Soluten gehören die Polyole Mannitol und Glycerol. Erythritol, Rybitol sowie Trehalose und Prolin wurden ebenso vorgefunden (REED *et al.* 1987; FÖRSTER *et al.* 1998; RAMIREZ *et al.* 2004). Einige der Pilze produzieren ein Gemisch aus osmoprotektiven Substanzen, das viel effizienter als ein einzelner Stoff, den Wasserdruck in der Zelle erhöhen kann (DAVIS *et al.* 2000; RAMIREZ *et al.* 2004). Stresst man z.B. *Dendryphiella salina* oder *Penicillium chrysogenum* mit jeweils 0,5 bzw. 0,7 M NaCl, wird das osmotische Gleichgewicht durch die Bildung von Mannitol, Arabinitol, Glycerol und Erythritol erreicht (BLOMBERG & ADLER, 1993). Bei der Kultivierung von *Ashbya gossypii* in 0,2 und 0,4 M NaCl wurde auch eine erhöhte Aktivität von Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym in der Glycerolbiosynthese, festgestellt. Die damit verbundene Glycerolproduktion trug zum osmotischen Gleichgewicht unter hyperosmolaren Bedingungen bei (FÖRSTER *et al.* 1998).

Die hohen Energiekosten, die für die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes verwendet werden, zeigen sich unter z.B. Salzstressbedingungen in reduziertem Wachstum. Durch die vermehrte Produktion von kompatiblen Soluten (z.B. Glycerol) wird ein bedeutender Teil von Glucose in diesen Alkohol umgewandelt und kann somit nicht zur Energiebildung (ATP) herangezogen werden (BLOMBERG & ADLER, 1992). Nach FÖRSTER *et al.* (1998) verfügen die Pilze, wie z.B. *Ashbya gossypii* und *S. cerevisiae* über Transportmechanismen, die bei der Kultivierung in hohen Salinitäten für die Ausscheidung von den toxischen Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma zuständig sind. Die Autoren vermuten, dass sich die damit verbundenen Energiekosten ebenfalls wachstumsreduzierend auswirken (vgl. 1.1.3). Dabei lässt sich der Einfluss von abnehmendem Wasserpotential auf die Geschwindigkeit des Hyphenwachstums durch das in der Abbildung 1.4 dargestellte Schema erklären.

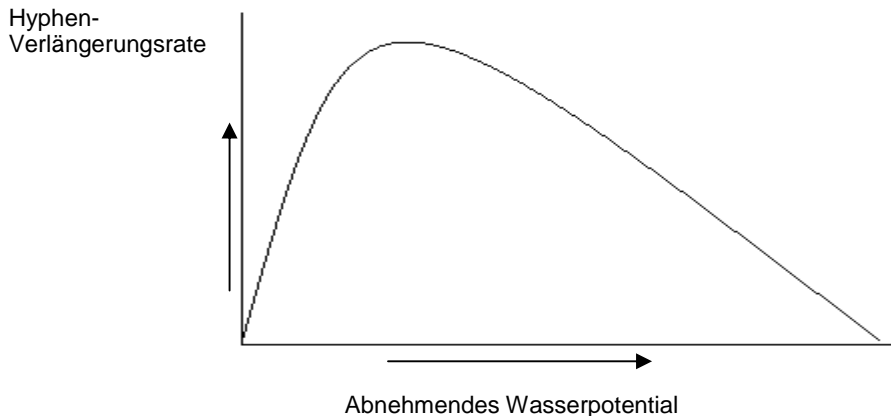


Abb. 1.4 Das idealisierte Verhältnis zwischen Wachstum und Wasserpotential. Modifiziert nach MAGAN, 1997

1.7 ITS und 28S-rRNA als molekulares Target für die Identifizierung von Pilzspezies

In der vorliegenden Arbeit wurde die Artbestimmung von den vier ausgewählten Pilzisolaten TUB6911, TUB6927, TUB6930 und TUB6935 u.a. mit Hilfe der 28S-rRNA- und ITS-Region durchgeführt. Zur Identifizierung von Mikroorganismen wird oft der ribosomale rDNA - Genkomplex herangezogen. Bei den Pilzen besteht er aus Genen, die für die ribosomale RNA (rRNA) kodieren (18S, 5.8S und 28S) und sich durch eine langsame Mutationsrate auszeichnen. Die 18S-rDNA ist dabei am höchstens konserviert (Abb. 1.5). Die nichtkodierenden variablen Sequenzen innerhalb des Komplexes werden durch den internen transkribierenden Spacer (ITS) repräsentiert, der sich aus ITS1 und ITS2 zusammensetzt (IWEN *et al.* 2002).

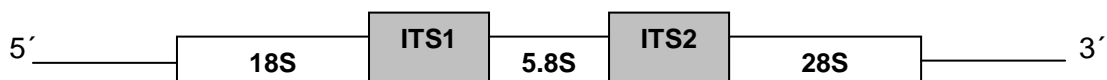


Abb. 1.5 Aufbau des rDNA-Genkomplexes bei den Pilzen (nach IWEN *et al.* 2002). ITS – Interner transkribierender Spacer.

Die konservierten und variablen Regionen der rDNA-Gene liefern phylogenetische Informationen, die bei den taxonomischen Studien eingesetzt werden können. Die 18S-rDNA-Region (kleine ribosomale Untereinheit; SSU) enthält nach KOWALCHUK (1999) und ZUCCARO *et al.* (2003) nicht die notwendige Variation, um eine Unterscheidung zwischen nahverwandten Taxa zu erlauben. Eine höhere Sequenzvariation innerhalb von 28S-rDNA (große ribosomale Untereinheit, LSU) lässt oft eine Identifizierung bis

zum Gattungsniveau zu. Dazu eignen sich besonders gut die stark variablen D2- und D8-Regionen der LSU (Abb. 1.6) (HOPPLE & VILGALYS, 1999; ZUCCARO *et al.* 2003; MITCHELL & ZUCCARO, 2006). Die noch höhere Variabilität in der ITS-rDNA-Region erlaubt eine Unterscheidung von Arten oder Stämmen (ZUCCARO *et al.* 2004; MITCHELL & ZUCCARO, 2006).

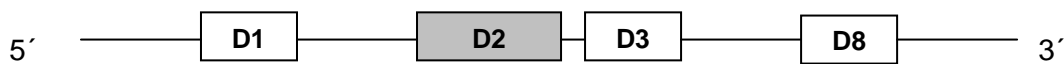


Abb. 1.6 Vereinfachtes Schema des 28S-rRNA-Gens. Die Kästchen repräsentieren die variablen, die Linien die konservierten Regionen. Die bei der Identifizierung verwendete Region wurde grau markiert. Modifiziert nach ZUCCARO *et al.* (2003).

Zur Durchführung von Phylogeniestudien werden gegenwärtig verschiedene Gene herangezogen. Die Pionierarbeiten zur Analyse von *Trichoderma*-Spezies basierten z.B., außer auf ITS1 und ITS2 auch auf den Sequenzen von dem fünften Intron des Translation-Elongation-Faktors 1-alpha (*tef1*), der partiellen Sequenz des Exons aus der Endochitinase 42 (*ech42*) und der Sequenz des Gens, das für die kleine mitochondriale rRNA- Untereinheit kodiert (KULLNIG-GRADINGER *et al.* 2002). In der von KOPCHINSKIY *et al.* (2005) entwickelten öffentlichen Datenbank *TrichoBLAST* werden die Sequenzen von den genetisch charakterisierten *Trichoderma*- und *Hypocrea*-Spezies deponiert. Dabei enthalten sie Informationen über die am häufigsten verwendeten phylogenetischen Marker. Hierzu zählen ITS1, ITS2, zwei Introns (*tef1_int4* und *tef_int5*) und ein Exon (*tef1_exon6*) des *tef1*-Gens sowie ein Fragment des für die Untereinheit 2 des RNA-Polymerase kodierenden Gens (*rbp2-exon*) (DRUZHININA *et al.* 2006).

1.8 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung des Einflusses von Salzstress und Pizbesiedlung auf die Pflanzen der bei der Dünenbesiedlung ökologisch wichtige Strandhafer (*Ammophila arenaria* (L.) Link) als Modellorganismus ausgewählt (vgl. 1.3).

Zu den wichtigsten Fragestellungen der vorliegenden Arbeit gehörten, welchen Einfluss der Salzstress auf die ausgewählten Parameter des Strandhafers nimmt sowie wie sich die Besiedlung von *A. arenaria* mit den nicht pathogenen Pilzen (werden in der vorliegenden Arbeit als **Endophyten** bezeichnet) oder mit den pathogenen Isolaten auf die salzgestressten *A. arenaria*- Pflanzen auswirkt.

Zur Durchführung der Experimente wurden die Strandhaferpflanzen ohne Salz bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM) gestresst und / oder mit jeweils einem der endophytischen Pilze (*Acremonium strictum*, [*Ac. strictum*],

Microdochium bolleyi [*M. bolleyi*] oder der pathogenen Isolate (*Fusarium culmorum* [*F. culmorum*] bzw. *Gaeumannomyces graminis* [*G. graminis*]) inokuliert und über 4 Wochen kultiviert (s. 2.3). Dieser Zeitraum wurde gewählt, da er die in der Umwelt herrschenden Bedingungen genauer widerspiegelt und somit eine Praxisnähe herstellt.

Zu den Parametern, die untersucht werden sollten, gehörten u.a. die Biomasse (vgl. 2.4) und Veränderungen im Aminosäurenpool (s. 2.7.1). Dabei stand L-Prolin, das als kompatibles Solut eine bedeutungsvolle Funktion im Schutz der Pflanze gegen den Salzstress hat, im Zentrum der Ermittlungen. Es sollten ebenfalls die Konzentrationsänderungen von L-Glutamat (involviert in die Biosynthese von L-Prolin und anderen Aminosäuren) bestimmt sowie die Aktivitäten der Enzyme Ferredoxin abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT, vgl. 2.7.3) und Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS, s. 2.7.4) untersucht werden, die jeweils in die Bildung von L-Glutamat und L-Prolin eingreifen. Ferner sollten die auf den Salzstress und / oder Pilzbesiedlung zurückgehenden Veränderungen im Kohlenhydratpool der *A. arenaria*-Pflanzen untersucht werden (vgl. 2.7.2). Ein weiteres Ziel der Arbeit war, die Expressionsregulation der Prolindehydrogenase aus *A. arenaria* (*AaPDH*) in den Langzeit- und Kurzzeitversuchen mittels reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR, vgl. 2.8.2) zu ermitteln. Das Enzym katalysiert die Prolinoxidation, wobei seine Expression unter den Salzstressbedingungen runterreguliert wird.

Weiterhin sollte in den Infektionsversuchen mit den endophytischen Pilzisolaten *A. strictum* und *M. bolleyi* die wichtige Frage geklärt werden, inwiefern die Endophyten die Folgen von Salzstress bei Strandhafer mildern können (vgl. 2.3.1; 3.2.1 und 3.4). Die Isolierung der Pilzisolate aus den *A. arenaria*-Pflanzen (vgl. 2.2.1) sowie die Reinfektionsversuche (s. 2.2.2) sollten die ersten Hinweise über die mögliche Zusammensetzung der mit dem Strandhafer assoziierten Pilzgemeinschaft sowie den Status der Isolate *in planta* liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Arbeiten mit *Ammophila arenaria*

2.1.1 Herkunft und Oberflächensterilisation von Strandhafer

Ammophila arenaria (L.) Link wurde von 5 verschiedenen Standorten bezogen: Ahrenshoop, Strande (Ostsee; OS), Nienhof und Schillig (Nordsee; NS) in Deutschland sowie von der dänischen Insel Mandö (NS). Die Probenahmen erfolgten in den Jahren 2002, 2003 und 2004 (vgl. Tab. 3.1).

Für die Isolierung der Pilze aus *A. arenaria*- Pflanzen wurde das nährstoffarme Kartoffel-Möhre-Medium (KM; HÖLLER *et al.* 2000) gewählt. Dieses Medium fördert eine schnelle Sporulation der Pilze und ermöglicht somit ihre Identifizierung aufgrund morphologischer Merkmale (DRAEGER S.; mündliche Mitteilung). Um das konzentrierte Medium herzustellen, wurden jeweils 1000 g Kartoffeln und Karotten klein geschnitten, mit 2 L Wasser vermischt, über 30 min gekocht und nach dem Abkühlen püriert. Anschließend erfolgte ein Auffüllen mit Wasser auf 5 L. Das Konzentrat wurde danach in 100 mL Behälter eingefüllt (Endgehalt von Karotten und Kartoffeln jeweils 20 g und 60 mL Wasser) und bei – 70 °C eingefroren. Um das Medium herzustellen wurden 100 mL des Konzentrates mit *aqua dest.* auf 1000 mL aufgefüllt und ohne den pH-Wert einzustellen, autoklaviert (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Zusammensetzung des KM-Mediums

Substanz	Menge
Kartoffeln	20 g
Möhren	20 g
ad <i>aqua dest.</i>	1000 mL

Zur Herstellung von KM-Platten wurden dem KM-Medium 12 g/L Agar zugesetzt.

Um die Pilze zu isolieren, die zum Zeitpunkt der Probenahmen die gesunden Strandhaferpflanzen besiedelten, wurden die Pflanzen oberflächensterilisiert (s. Tab. 2.2). Dieser Vorgang beseitigt alle auf der Oberfläche lebenden Organismen (Epiphyten). Dazu wurden die gesunden Pflanzenteile zuerst mit Leitungswasser kurz gespült und danach,

unter sterilen Bedingungen, mit Ethanol (EtOH) und Natriumhypochlorid (NaOCl) behandelt. Anschließend wurden sie mit sterilem Leitungswasser gespült und auf Filterpapier getrocknet. Der Erfolg der Sterilisation wurde durch das Abdrücken der Pflanzenteile auf KM-Agar überprüft. Um die Vermehrung von Bakterien zu unterbinden wurde das KM-Medium, nachdem es auf 55 °C abgekühlt war, mit folgenden Antibiotika supplementiert: 60 mg Penicillin G, 80 mg Streptomycin-Sulfat und 50 mg Tetracyclin x HCl (jeweils pro 1 L).

Tab. 2.2 Bedingungen der Oberflächensterilisation für *A. arenaria*

Reagenz	Wurzel	Stängel	Blatt
EtOH 70%ig (v/v)	15 s	30 s	30 s
*Natriumhypochlorid-Lsg. 3%ig (v/v)	15 s	1 min	1 min
steriles Leitungswasser	3 x 3 min	3 x 3 min	3 x 3 min

* Die erhältliche NaOCl-Lösung enthält 12 % aktiven Chlor

Nach der Oberflächensterilisation wurden die Pflanzen unter sterilen Bedingungen in 1 bis 2 mm kurze Stücke geschnitten und auf KM-Agar mit Antibiotika ausgelegt (max. 5 Segmente pro Petrischale). Das Auswachsen der Pilze aus den pflanzlichen Segmenten wurde täglich kontrolliert. Die ausgewachsenen Mikroorganismen wurden anschließend, zur Erhaltung von Reinkulturen, auf festes KM-Medium überimpft und über 2 bis 3 Wochen bei Raumtemperatur (RT) kultiviert. Die aus Strande und Ahrenshoop stammenden und identifizierten Isolate wurden später in den internen Katalog der TU-Braunschweig (TUB) aufgenommen (vgl. Tab. 3.2).

2.1.2 Anzucht von axenischen *A. arenaria*- Pflanzen

Um den Einfluss von den äußeren Faktoren so gering, wie möglich zu halten, wurden die in der vorgelegten Arbeit dargestellten Versuche mit axenisch angewachsenem *A. arenaria*- Keimlingen unter konstanter Temperatur und unter definierten Lichtverhältnissen (vgl. 2.1.3) durchgeführt. Damit war die selektive Untersuchung des Einflusses von Salzstress und / oder der Pilzbesiedlung auf ausgewählte Parameter der Strandhafermetabolismus möglich.

Die bei dieser Arbeit eingesetzten *A. arenaria* - Samen stammten aus zwei verschiedenen Quellen: eine Partie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Georg Kowalchuk (Institute of Ecology; Centre for Terrestrial Ecology; Niederlande) zur Verfügung gestellt. Eine andere wurde von der Firma Sandeman Seeds, Lalongue (Frankreich), bezogen. Die Samen wurden über Nacht in kaltem Leitungswasser gequollen. Anschließend fand, um

Epiphyten abzutöten, ihre Oberflächensterilisation unter folgenden Bedingungen statt (modifiziert nach KOWALCHUK *et al.* 1997):

- 70 % v/v EtOH für 1 min
- 5 % v/v NaOCl-Lösung für 40 min
- steriles Leitungswasser für 3 x 3 min
- Trocknen auf einem sterilen Filterpapier

Die Plastiktöpfe Phytakon (Sigma; Deutschland) wurden mit jeweils 200 g Sand (Korngröße 0,18 mm; Schlingmeier Quarzsand, Schwülper) befüllt und autoklaviert. Nach der Oberflächensterilisation wurden die auf sterilem Filterpapier getrockneten Samen auf den Sand der Phytakon-Töpfe transferiert (ca. 25 – 30 Samen pro Topf) und mit einer dünnen Sandschicht bedeckt. Die Düngung erfolgte mit sterilem Murashige & Skoog – Medium (M&S; Zusammensetzung s. Anhang K). Die Töpfe wurden anschließend mit Deckeln verschlossen und die Samen in einer temperierbaren Klimakammer unter folgenden Bedingungen über 1 - 2 Wochen inkubiert: 8 h Dunkelheit bei 18 °C und 16 h Lichtphase bei 26 °C. Die angewachsenen 5 – 7 Tage alten Strandhaferkeimlinge wurden in neue Sandtöpfe umgesetzt (vgl. 2.1.3) und bei allen weiteren Versuchen (vgl. 2.3) verwendet.

2.1.3 Kultivierungsbedingungen



Abb. 2.1 Wachstum von *Ammophila arenaria* in Plastiktöpfen Phytacon (Sigma, Deutschland)

Die Kultivierung von *A. arenaria*-Pflanzen während der Versuche erfolgte über vier Wochen in einer Pflanzenwuchskammer (Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen) bei einer konstanten Temperatur von 18 °C und einem Tag/Nacht- Rhythmus von 16 zu 8 h. Damit die Konkurrenz um die Nährstoffe so gering wie möglich ausfiel, wurden 10 Pflanzen pro Plastiktopf eingepflanzt. Um während der Kultivierung den Pflanzen genügend Platz zum Wachstum gewährezuleisten, wurden zwei Plastiktöpfe zusammengefügt und mit Parafilm abgedichtet. Zum Gasaustausch befand sich in dem oberen Gefäß ein mit Watte gestopft Loch (Abb. 2.1).

Die Versorgung der Pflanzen mit Mikro-, Makroelementen und Vitaminen erfolgte durch die Düngung mit dem M&S-Medium, das für die Salzstressversuche mit entsprechenden Mengen an NaCl versetzt wurde (vgl. 2.3.1).

2.2 Isolierung und Identifizierung der Pilzisolat sowie Reinfektionsversuche

2.2.1 Isolierung und Identifizierung der Pilzisolat

Wie unter 2.1.1 beschrieben, wurden die aus den oberflächensterilisierten Strandhafer-Segmenten ausgewachsenen Pilze zur Erhaltung von Reinkulturen auf frisches KM-Medium überimpft und für 2 – 3 Wochen bei RT kultiviert. Die angewachsenen Mikroorganismen wurden mikroskopiert und aufgrund ihrer morphologischen Merkmale mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Siegfried Draeger identifiziert (vgl. Tab. 3.1).

2.2.2 Reinfektionsversuche

Um das Infektions- bzw. Besiedlungspotential der isolierten Pilze zu überprüfen, wurden Reinfektionsversuche mit axenischen Strandhaferkeimlingen durchgeführt (vgl. 2.1.2). Für die Reinfektionsversuche wurden Pilzisolats eingesetzt (s. 3.1.2 und Tab.3.1), die von den Probenahmeorten Ahrenshoop und Strande isoliert wurden. Von insgesamt 59 Pilzisolaten, die aus den Pflanzen von diesen Orten isoliert werden konnten, wurden unter Ausschluss von mehrfach vorkommenden Isolaten, 39 identifizierte Stämme ausgewählt (vgl. Tab. 3.2). Ferner wurden diese Pilzisolats in die interne Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie (TUB) aufgenommen und mit den Nummern von 6911 bis 6946 versehen (s. Tab. 3.2).

Die Inokulierung von 5 – 7 Tage alten *A. arenaria*- Keimlingen mit den Pilzen erfolgte über die Wurzel. Dazu wurden die mit Pilzen bewachsenen 2 - 3 Wochen alten KM-Agarplatten mittels einer Impföse in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke geteilt. Die Stücke wurden ausgehoben und in die Phytakon-Plastiktöpfe auf Sand gelegt (10 pro Plastiktopf). Auf jedem dieser Agarblöckchen wurde ein Keimling platziert, die Wurzeln wurden vollständig mit Sand bedeckt und mit M&S-Medium gedüngt. Pro Mikroorganismus wurden 10 Pflanzen infiziert und über drei Wochen in einer Phytokammer unter Standardbedingungen kultiviert (vgl. 2.1.3). Danach erfolgte die Ernte und die Oberflächensterilisation (s. 2.1.1) von den Pflanzen. Anschließend wurden Wurzeln, Stängel und Blätter unter sterilen Bedingungen in kurze Segmente geschnitten und erneut auf KM-Agar ausgelegt. Wuchs der bei der Inokulierung eingesetzte Mikroorganismus aus den Pflanzensegmenten heraus, galt die Reinfektion als erfolgreich (s. 3.1.2 und Tab. 3.2).

2.3 Versuchsreihen mit *Ammophila arenaria*

In den über vier Wochen andauernden **Langzeitversuchen** sollte der Einfluss von pathogenen und endophytischen, mit Strandhafer assoziierten Pilzen auf salzgestressten *A. arenaria*- Pflanzen erforscht werden. Dazu wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Pflanzen ohne Salz kultiviert bzw. mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 375 mM) gestresst und / oder mit Pilzisolaten inokuliert wurden (s. 2.3.1). Nach dem Ablauf der Versuche wurden Veränderungen der Biomasse (s. 2.4), der Aminosäuregehalte (mittels HPLC; s 2.7.1), des Zucker- und Zuckeralkoholpools (mittels HPLC; s 2.7.2) sowie die spezifischen Aktivitäten von Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT, mittels HPLC; s. 2.7.3) und Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS, spektrophotometrisch; s. 2.7.4) ermittelt. Zusätzlich erfolgte die

Bestimmung der Expressionsregulation von der Prolindehydrogenase (*AaPDH*) mittels reverse Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR, s. 2.8.3).

In den über 48 h andauernden **Kurzzeitversuchen** erfolgte die Ermittlung der Expressionsregulation von *AaPDH* mittels RT-PCR. Hierfür wurden die angewachsenen Strandhaferpflanzen einem 250 mM NaCl-Stress ausgesetzt und anschließend rehydriert (s. 2.3.2 und 2.8.3).

2.3.1 Langzeitversuche

Die Experimente verliefen in vier Versuchsreihen (*A*, *B*, *C* und *D*). Hierfür wurden 5 – 7 Tage alte Keimlinge (s. 2.1.2) in neue, mit je 200 g Sand gefüllte Phytacoon-Töpfe transferiert und wie unter 2.1.3 beschrieben über vier Wochen kultiviert. Die Experimente aus den Versuchsreihen *A*, *B* und *C* wurden mit jeweils 300 Pflanzen (drei Parallelen à 100 Pflanzen) durchgeführt. Die Bestimmung der Expressionsregulation von *AaPDH* (Versuchsreihe *D*) erfolgte alternativ mit 120 Pflanzen (3 Parallelen à 40 Pflanzen).

Versuchsreihen:

- A)** Zum **Einfluss von Salzstress auf Strandhafer** wurden die Pflanzen mit M&S-Medium gedüngt, das entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle I) bzw. nach Verdünnung aus einer sterilen, wässrigen 5 M NaCl-Stammlösung mit drei verschiedenen NaCl-Endkonzentrationen (125 mM, 250 mM und 375 mM) verwendet wurde. Pro NaCl-Konzentration wurden jeweils 300 Pflanzen dem Salzstress ausgesetzt (Abb. 2.2). Hierfür wurden *A. arenaria*-Keimlinge (vgl. 2.1.2) leicht in den Sand eingedrückt und die Wurzeln mit einer Schicht Sand bedeckt. Die Kultivierung von *A. arenaria* erfolgte über vier Wochen in einer Phytokammer (vgl. 2.1.3).

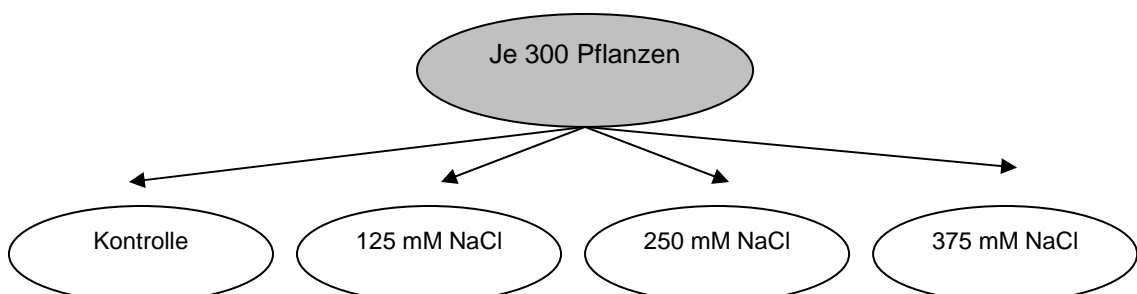


Abb. 2.2 Schema der Experimente zur Versuchsreihe *A* (Einfluss von Salzstress auf *A. arenaria*; durchgeführt mit insgesamt 1200 Pflanzen) (s. 2.3.1 A).

B) Zur **Untersuchung der Auswirkung von Pilzbesiedlung** wurden *A. arenaria*-Pflanzen mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert (s. 2.2), das entweder pathogene (*Fusarium culmorum* TUB6927 und *Gaeumannomyces graminis* TUB6935) oder nicht pathogene (*Acremonium strictum* TUB6911 und *Microdochium bolleyi* TUB6930) Eigenschaften aufwies (Abb. 2.3). Die Inokulation der Keimlinge erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Pro Plastiktopf wurden dabei 10 Pflanzen eingesetzt und mit dem M&S-Medium ohne NaCl gedüngt. Anschließend erfolgte die Kultivierung über vier Wochen (vgl. 2.3.1). Bei den Kontrollpflanzen tauchten die Wurzeln in unbewachsene Agarstücke hinein (Kontrolle II).

C) Zur **Untersuchung des Einflusses von Salzstress und Besiedlung mit den Pilzisolaten auf *A. arenaria*** wurden die Keimlinge in jeweils einer der NaCl-Konzentrationen kultiviert (wie unter A) und gleichzeitig mit je einem der Pilzisolat inokuliert (wie unter B). Als Kontrollgruppe fungierten mit M&S-Medium gedüngte, auf sterilen Agarstücken wachsende Pflanzen (Abb. 2.3). Die Kultivierung erfolgte über vier Wochen in einer Phytokammer (s. 2.1.3).

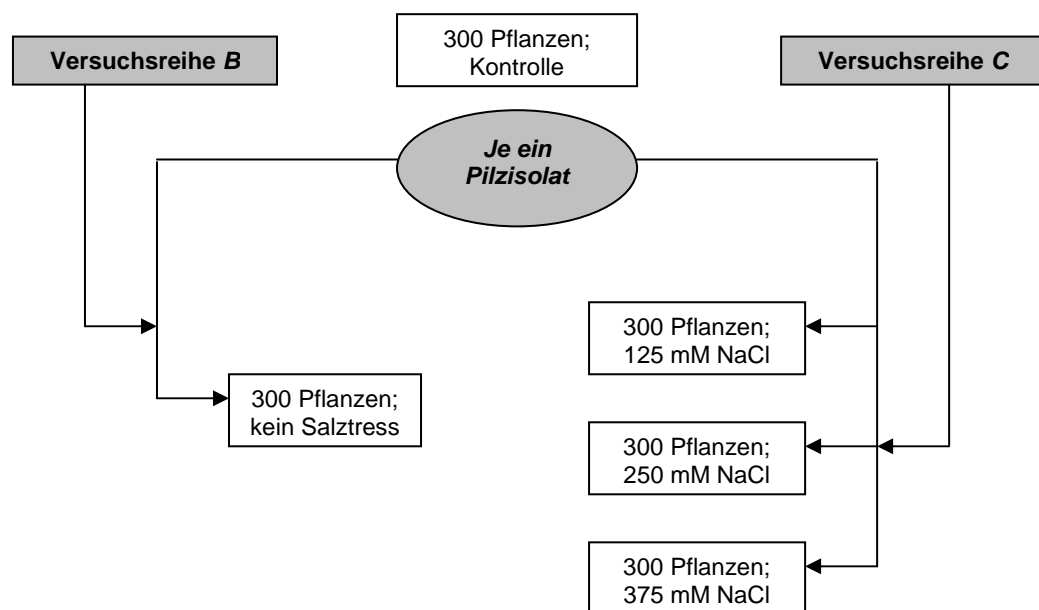


Abb. 2.3 Schema der Experimente zu den Versuchsreihen 2.3.1 B – C. Jeweils 300 *A. arenaria*-Pflanzen wurden mit je einem der Pilzisolat (*Ac. strictum* TUB6911, *F. culmorum* TUB6927; *M. bolleyi* TUB6930 oder *G. graminis* TUB6935) inokuliert und ohne Salz (Versuchsreihe B) bzw. mit 125, 250 oder 375 mM NaCl im M&S-Medium kultiviert (Versuchsreihe C). Als Kontrolle wurden mit M&S-Medium gedüngte und auf sterilen Agarstücken wachsende Pflanzen verwendet (durchgeführt mit insgesamt 5100 Pflanzen); (s. 2.3.1 B – C).

D) Die Bestimmung der Expressionsregulation von der Prolindehydrogenase aus *A. arenaria* unter Einwirkung von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung

erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR (s. 2.8.3). Hierfür wurden pro Versuch 120 Strandhaferkeimlinge (in drei Parallelen à 40 Pflanzen) ohne Salz (Kontrolle) bzw. in jeweils einer der NaCl-Konzentrationen kultiviert (wie unter A beschrieben) oder mit *Ac. strictum* TUB6911 bzw. mit *F. culmorum* TUB6927 inokuliert (Abb. 2.4). Die Kultivierung erfolgte über vier Wochen und in einer Phytokammer (s. 2.1.3).

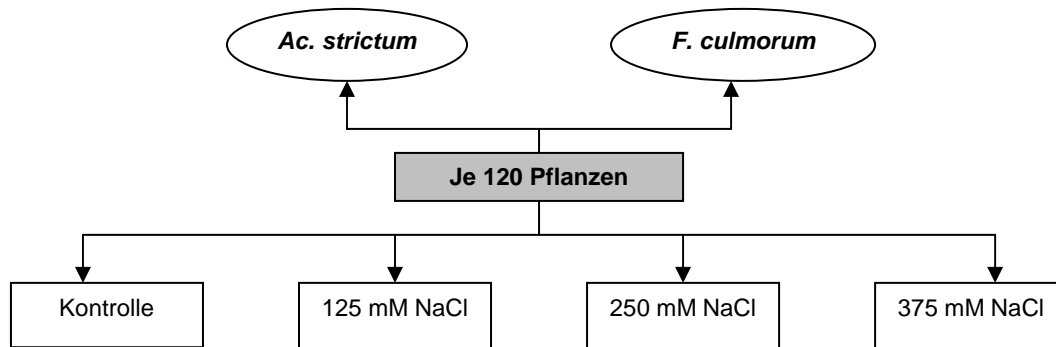


Abb. 2.4 Schema der Experimente zur Versuchsreihe D (s. 2.3.1 D). Jeweils 120 *A. arenaria*-Pflanzen wurden mit einem der Pilzisolat (*Ac. strictum* TUB6911 oder *F. culmorum* 6927) inokuliert oder ohne Salz (Kontrolle) bzw. mit 125, 250 oder 375 mM NaCl im M&S-Medium kultiviert (durchgeführt mit insgesamt 480 Pflanzen).

Nach dem Versuchsablauf wurden die Pflanzen aus den Versuchsreihen A, B und C mit den Wurzeln aus den Plastiktöpfen entfernt, kurz mit sterilem Wasser gespült und getrocknet. Bei den von den Pilzisolaten besiedelten Pflanzen wurden, um den Infektionserfolg zu überprüfen, zwei bis drei geerntete Pflanzen aus jedem Versuch oberflächensterilisiert (2.1.1), unter sterilen Bedingungen in 1 - 2 mm kleine Stücke geschnitten und die Segmente auf KM-Agar (s. Tab. 2.1) ohne Antibiotikazugabe ausgelegt. Das Auswachsen der Pilze aus den Pflanzensegmenten (Wurzeln, Stängel und Blätter) wurde täglich kontrolliert.

Bei der Durchführung aller Versuche wurden nur die oberirdischen Teile der Pflanzen verwendet, da nach Ablauf einiger Experimente (z.B. nach der Inokulierung mit dem Pilzisolat *G. graminis*) die Wurzeln zu wenig Biomasse bildeten und daher nicht benutzt werden konnten. Für die anschließenden Untersuchungen wurden die Pflanzen aus den Versuchsreihen A, B und C über 24 h lyophilisiert (s. 2.4). Die für die Ermittlung der Expressionsregulation von *AaPDH* bestimmten Pflanzen (Versuchsreihe D) wurden nach dem Versuchsablauf geerntet und sofort bei – 70 °C eingefroren.

2.3.2 Kurzzeitversuche zur Untersuchung der Expressionsregulation von *AaPDH*

Zur Bestimmung der Expressionsregulation der Prolindehydrogenase aus *A. arenaria* (*AaPDH*) wurde in den dargestellten Kurzzeitversuchen eine 48-stündige Salzstressbehandlung von den Strandhafer-Pflanzen vorgenommen. Da die Vorversuche gezeigt hatten, dass eine Kultivierung von *A. arenaria* in 250 mM NaCl besonders gravierende Veränderungen *in planta* hervorruft (Daten nicht gezeigt), wurde diese Salzkonzentration gewählt, um die Regulation der Expression von *AaPDH* in den Kurzzeitversuchen zu ermitteln.

Für die Ermittlung der *AaPDH*-Expression wurden 120 drei Wochen alte *A. arenaria*-Pflanzen in frische, mit je 200 g Sand gefüllte Plastiktöpfe überführt. 80 Pflanzen wurden mit 250 mM NaCl im M&S-Medium gedüngt und für 48 h gestresst. Nach Ablauf von 48 h wurde die Hälfte dieser Pflanzen geerntet und bei – 70 °C eingefroren. Die übrigen 40 wurden erneut auf frischen Sand transferiert und mit M&S-Medium ohne Salzzugabe gedüngt, um den Strandhafer für 6 h zu rehydrieren (Erholungsphase). Als Kontrolle wurden diejenigen 40 Pflanzen verwendet, die für 48 h mit M&S-Medium behandelt wurden. Die rehydrierten Pflanzen wurden nach Ablauf des Versuches wie die Kontrollpflanzen geerntet und bei – 70 °C eingefroren (Abb. 2.5).

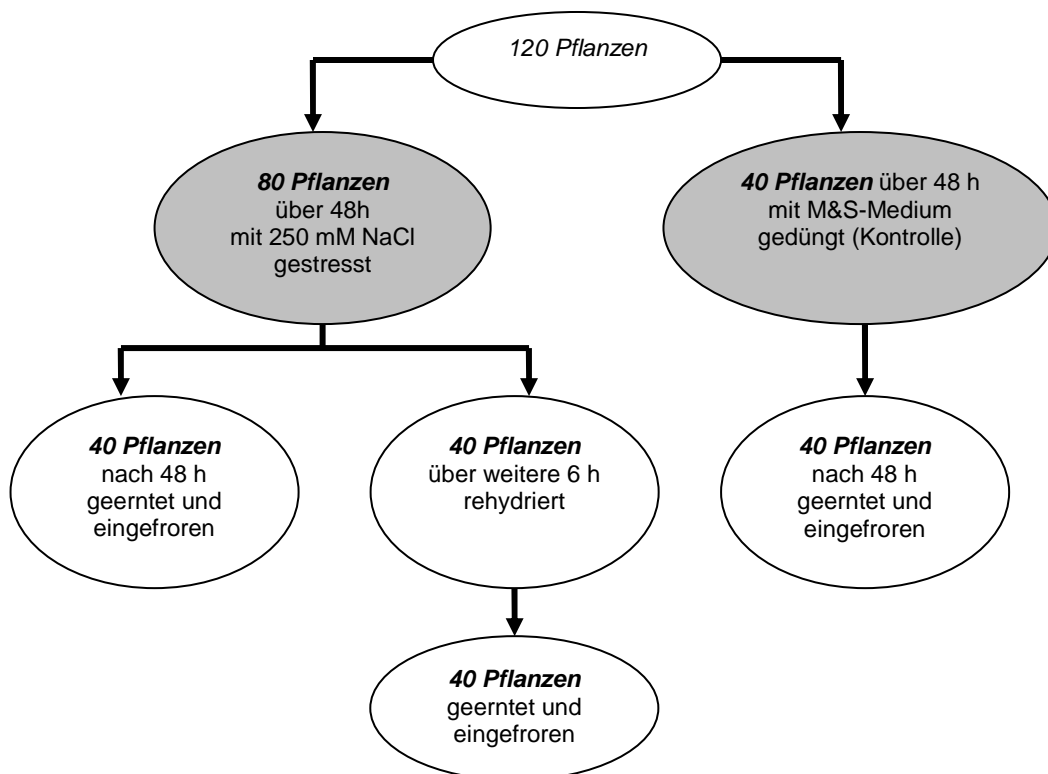


Abb. 2.5 Schema der Versuche, die zur Bestimmung der Expressionsregulation von *AaPDH* in Kurzzeitversuchen (über 48 h) durchgeführt wurden (s. 2.3.2).

Für die RNA-Extraktion (s. 2.8.3.1) und die Durchführung der RT-PCR (s. 2.8.3), die direkt der Ermittlung der Genexpression von *AaPDH* diene, wurden nur die oberirdischen, nicht lyophilisierten und bei – 70 °C eingefrorenen Pflanzen verwendet.

2.4 Lyophilisierung der Pflanzen und Bestimmung der Biotrockenmasse

Nach Ablauf der Experimente aus den Versuchsreihen A, B und C (s. 2.3.1) wurden die *A. arenaria*- Pflanzen lyophilisiert und anschließend ihre Biotrockenmasse (BTM) ermittelt. Hierfür wurde das frische Strandhafer-Pflanzematerial direkt nach der Ernte kurz mit Leitungswasser gespült und mit Papiertüchern getrocknet. Die Wurzeln wurden entfernt. Die Pflanzen wurden in die 50 mL Reaktionsgefäße überführt, mit Deckeln verschlossen und für 2 h bei – 70 °C eingefroren. Danach folgte die Lyophilisierung des tief eingefrorenen Pflanzenmaterials (Alpha 1-4, Christ; Osterode) über 24 h in offenen, mit Zellstoff abgedeckten Gefäßen und anschließend die Bestimmung der Biotrockenmasse vom lyophilisierten Pflanzenmaterial mit der Analysenwaage (MC1; Sartorius, Göttingen). Nach der Ermittlung der Biotrockenmasse lagerte das gefriergetrocknete Material bis zur weiteren Verarbeitung dicht verschlossen, in Dunkelheit und bei Raumtemperatur.

2.5 Mikroskopische Untersuchungen

Um zu ermitteln, ob die Pilze während der Infektionsversuche den Strandhafer inter- bzw. intrazellulär besiedeln, wurden Schnitte von inokulierten Pflanzen angefertigt. Das auf unterschiedliche Weise präparierte Pflanzenmaterial wurde geschnitten, gefärbt und anschließend mikroskopiert (s. 3.1.3).

2.5.1 Präparation des Pflanzenmaterials

Um die Pilzstrukturen innerhalb des pflanzlichen Gewebes sichtbar zu machen, wurden die von Pilzen besiedelten und über drei Wochen kultivierten *A. arenaria*- Pflanzen verwendet (s. 2.2.2). Zur Präparation des Strandhafers für das Mikroskopieren wurden verschiedene Techniken angewendet. Das pflanzliche Material wurde dabei entweder im frischen oder im fixierten Zustand bearbeitet (MERTENS E, 1999; DAMMAN, U, 1997). Zusätzlich fand eine Kunstharzeinbettung statt. Von dem bearbeiteten Pflanzenmaterial wurden sowohl Quer- als auch Längsschnitte angefertigt.

- Aus frischem Pflanzenmaterial wurden mittels eines Ultrakryomikrotoms (Frigomobil 1026; Reichert-Jung) 20 µm dünne Tieftemperatur-Schnitte

angefertigt, die anschließend für 30 s in einer 0,1 % (w/v) Anilin-Lactoglycerin-Färbelösung (färbt Cellulose und Chitin) gefärbt wurden. Diese setzte sich wie folgt zusammen:

90 % (v/v) Lactat	- 33 mL
87 % (v/v) Glycerin	- 33 mL
Anilinblau	- 100 mg
<i>aqua dest.</i>	- 33 mL

Die Färbelösung wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und die Schnitte kurz mit sterilem Leitungswasser gespült. Nach einer kurzen Trocknungszeit erfolgte das Mikroskopieren der Frischpräparate (Axiolab; Zeiss, Deutschland; 1000fache Vergrößerung) im Lactoglycerin (90 % v/v Lactat und 87 % v/v Glycerin; 1:1).

- Die Pflanzenteile wurden für 24 h in eine Fixierlösung (50 % v/v Ethanol absolut, 45 % v/v Essigsäure und 5 % v/v Formaldehyd) eingetaucht, die sich zur Aufbewahrung des Pflanzenmaterials eignet. Danach erfolgte das Schneiden in 20 µm dünne Schnitte (Ultrakryomikrotom Frigomobil 1026), eine anschließende Färbung in 0,1 % (w/v) Anilin-Lactoglycerin-Lösung sowie das Mikroskopieren der fixierten Präparate (Vorgehensweise - siehe oben).
- Bei der Kunsthharzeinbettung wurde das Polymerisationssystem Technovit 7100 zum Kunststoff-Einbetten von Gewebe in 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (GMA) verwendet (Heraeus Kulzer, Wehrheim). Dabei handelt es sich um eine Methode, die die Herstellung von transparenten Kunststoffblöckchen (Schnitte im Bereich von 1 µm möglich) sowie gutes Strecken und Einfärben der Präparate erlaubt. Für die Kunsthharzeinbettung musste das Pflanzenmaterial entsprechend entwässert werden. Dafür wurde es für je 2 h in 60 % (v/v), 80 % (v/v) und für zwei mal 2 h in 100 %igen (v/v) Ethanol gelegt. Anschließend folgte die Einbettung in Kunsthharz (Vorschrift s. Heraeus Kulzer, Wehrheim). Die auf diese Weise präparierten Pflanzenteile wurden mittels eines Ultramikrotoms geschnitten (Dicke 10 µm) und danach für 12 h getrocknet. Nach einer nachfolgenden 30 minütigen Thionin-Färbung (0,1 % w/v Thionin, 5 % v/v Glycerin und 94,9 % Leitungswasser; färbt Proteine) folgte das Mikroskopieren der Schnitte bei einer 1000fachen Vergrößerung.

2.5.2 Infektionsversuche mit Pflanzensegmenten

Für den Versuch wurden, wie unter 2.1.2 beschrieben, axenisch angewachsene Strandhaferkeimlinge in neue Phytacoon-Töpfe transferiert, mit M&S-Medium gedüngt und

über 4 Wochen in einer Phytokammer inkubiert (s. 2.1.3). Danach wurden die Pflanzen geerntet, in 1 cm kleine Stücke geteilt und jeweils drei davon auf das KM-Medium mit 0,9 % (w/v) Agar ausgelegt. In die Mitte einer vorbereiteten Agarplatte wurde jeweils ein mit Pilzmycelium und Sporen (*Acremonium strictum* TUB6911, *Fusarium culmorum* TUB6927, *Microdochium bolleyi* TUB6930 oder *Gaeumannomyces graminis* TUB6935) bewachsenes Agarstück platziert (Durchmesser 5 mm). Die Agarplatten wurden bei RT so lange inkubiert, bis der wachsende Mikroorganismus die pflanzlichen Segmente erreichte und sie überwuchs. Anschließend wurden die besiedelten Pflanzenteile wie unter 2.5.1 in Kunstharz eingebettet, mit Hilfe eines Ultramikrotoms geschnitten (7µm) und mikroskopiert (s. 3.1.3 und Abb. 3.2).

2.6 Physiologische Untersuchungen der Pilzisolat

2.6.1 Salztoleranz der Pilzisolaten und ihre Wachstumsraten

Die Salztoleranz der Pilzisolat sowie der Einfluss von NaCl auf die Wachstumsrate von den untersuchten Mikroorganismen sollten ermittelt werden. Für diese Experimente wurden vier aus Strandhafer isolierte Stämme ausgewählt: *Acremonium strictum* TUB6911, *Fusarium culmorum* TUB6927, *Microdochium bolleyi* TUB6930 und *Gaeumannomyces graminis* TUB6935 (vgl. 2.2.1 und 3.1.2). Die Vorkultivierung der Pilze erfolgte über 3 Wochen auf festem KM-Medium (Tab. 2.1) und bei RT (vgl. 2.2.1). Danach wurden aus dem bewachsenen KM-Agar mittels eines Korkenbohrers kleine Stücke (Durchmesser 5 mm) ausgestochen und in drei Parallelen pro Pilz auf frisches KM-Medium transferiert, das jeweils kein bzw. 0,75; 1,25 oder 2 M NaCl enthält. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte bei RT; die Wachstumskontrollen fanden alle 2 Tage über einen Zeitraum von 16 Tagen statt. Nach Ablauf des Versuches wurde die Wachstumsrate der untersuchten Pilzisolat (mm/Tag), in Abhängigkeit von Mediumsalinität, bestimmt (s. 3.3.2).

2.6.2 Ausgewählte Parameter des Pilzmetabolismus unter Salzstress

Zur Untersuchung der Einwirkung von Salzstress auf ausgewählte Parameter des Pilzmetabolismus, wie z.B. die Biotrockenmasse (s. 2.6.3 und 3.2.2), spezifische Aktivität von P5CS (vgl. 2.7.4 und 3.7) sowie die Veränderungen im Aminosäurenpool (s. 2.7.1 und 3.5), wurden zwei Isolate herangezogen: der endophytische Pilz *Acremonium strictum* TUB6911 und das Pathogen *Fusarium culmorum* TUB6927. Die Pilze wuchsen im flüssigen Czapek-Dox-Medium (Tab. 2.3) mit 2 % (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle,

ohne bzw. mit 0,75 M NaCl, über 24 Tage bei RT auf einem Schüttler (110 rpm). Die ausgewählte NaCl-Konzentration von 0,75 M erwies sich in den Vorversuchen zur Kultivierung von beiden Isolaten als geeignet. Die Inokulierung des Mediums erfolgte mit einer Sporensuspension in sterilem Leitungswasser. Die Sporen stammten von Pilzvorkulturen auf festen KM-Medien; die Ermittlung ihrer Konzentration wurde mit Hilfe einer Thoma-Kammer vorgenommen.

Tab. 2.3 Zusammensetzung des Czapek-Dox-Mediums in *aqua dest.*

Substanz	g / L
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	1,0

pH 6,5

Für das Experiment wurden pro Pilzisolat 8 x 3 Erlenmeyer-Kolben (für Probenahme an acht Terminen, alle drei Tage und drei Parallelansätzen pro Termin) mit jeweils 20 mL Czapek-Dox-Medium (ohne bzw. mit 0,75 M NaCl) gefüllt und mit einer Endkonzentration von 10⁵ / mL Sporen aus der Sporensuspension angeimpft. Alle drei Tage wurde das Inokulum, wie unter 2.6.3 beschrieben, geerntet, abfiltriert und anschließend lyophilisiert.

2.6.3 Lyophilisierung des Pilzmaterials und Bestimmung der Pilzbiotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse der Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Mediumsalinität wurden 20 mL des im flüssigen Czapek-Dox-Medium ohne bzw. mit 0,75 mM NaCl (vgl. 2.6.2) angezogenen Pilzmaterials auf Filter bekannten Gewichtes mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und nach der Feuchtgewichtsbestimmung über 72 h lyophilisiert. Anschließend erfolgte das Abwiegen des Filters samt Pilzmyzel mit Hilfe einer Analysenwaage (MC1; Sartorius, Göttingen). Ferner wurde das lyophilisierte Pilzmaterial bei der Untersuchung des Aminosäurepools (s. 2.7.1) sowie bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität von P5CS verwendet (s. 2.7.4).

2.7 Biochemische Untersuchungen

2.7.1 Veränderungen im Aminosäurenpool

Die Veränderungen im Aminosäurepool in den unter verschiedenen Bedingungen angezogenen *A. arenaria*-Pflanzen (s. 2.3.1 A, B und C) wurden mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmt. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung des Einflusses von NaCl-Stress auf den Aminosäurenmetabolismus der salzgetressten Pilzisolat *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 (vgl. 2.6.2).

2.7.1.1 Analytik von Aminosäuren mittels HPLC

Die Analytik von Aminosäuren erfolgte mittels einer Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase chromatographie), wo die Probesubstanzen von der Umkehrphasen-Oberfläche umso stärker festgehalten wurden, je weniger sie wasserlöslich waren (d.h. je unpolarer sie waren) (MEYER, 2002). Als stationäre Phase diente chemisch gebundenes Octadecylsilan (ODS); ein Alkan mit 18 C-Atomen.

2.7.1.2 Extraktion von freien Aminosäuren

Für die Extraktion von freien Aminosäuren (modifiziert nach WAGNER, 2002) wurden 50 mg des lyophilisierten Pflanzenmaterials (s. 2.4) zusammen mit 200 mg Sand in 5 mL eiskalten Extraktionspuffer (0,1 M TRIS-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol und 0,05 % Triton X-100; pH 7,6) über 2 min in einem Mörser und auf Eis homogenisiert. Der Extrakt wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß transferiert und 15 min bei 10000g (4 °C) abzentrifugiert (Laborfuge 2K15C, Sigma; Deutschland). Der Überstand wurde in zwei Fraktionen (A und B) getrennt: 2,5 mL des Überstandes B wurden in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bei – 70 °C eingefroren. Er wurde später für die Ermittlung der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT (2.7.3) sowie für die Proteinbestimmung (s. 2.7.5) verwendet. 2,5 mL des Überstandes A wurden in ein 50 mL Reaktionsgefäß transferiert und bis zum Ende des Extraktionsvorganges auf Eis gestellt. Das übrig gebliebene Pellet wurde in 5 mL 80% (v/v) Ethanol resuspendiert und erneut für 10 min bei 2000g zentrifugiert (Überstand C). Danach folgte eine Vereinigung von den Überständen A und C sowie eine Gefriertrocknung des Extraktes für 72 h. Nach der Lyophilisierung wurde der gefriergetrocknete Extrakt in 2 mL 0,5 M Natrium-Borat-Puffer (pH 7,7) (vgl. 2.7.1.3) resuspendiert (100 µL davon wurden für die Proteinbestimmung entnommen (s. 2.7.5)), mit 10 µL einer 125 mM Norvalinlösung (interner Standard) versetzt (s. 2.7.1.5) und für 2 min bei 10000g zentrifugiert. 80 µL des vorbereiteten

Extrakte wurden derivatisiert (s. 2.7.1.3) und in der HPLC analysiert (s. 2.7.1.4). Das Schema der Aminosäurextraktion ist in der Abbildung 2.6 dargestellt.

Das lyophilisierte Pilzmaterial (s. 2.6.3) wurde im Extraktionspuffer homogenisiert und wie das Pflanzenmaterial weiterverarbeitet. Dennoch ergaben sich, im Vergleich zur Bearbeitung des pflanzlichen Materials, bei der Extraktion von Aminosäuren aus den Pilzen einige Differenzen, die auf geringere Pilztrockenmassen zurück zu führen sind. Das bedeutet, dass sich die eingesetzten Extraktionspuffervolumina und dadurch die Überstandmengen veränderten. Die Abweichungen sind in der Abbildung 2.6 vermerkt.

50 mg lyophilisiertes Pflanzenmaterial oder Pilzmaterial

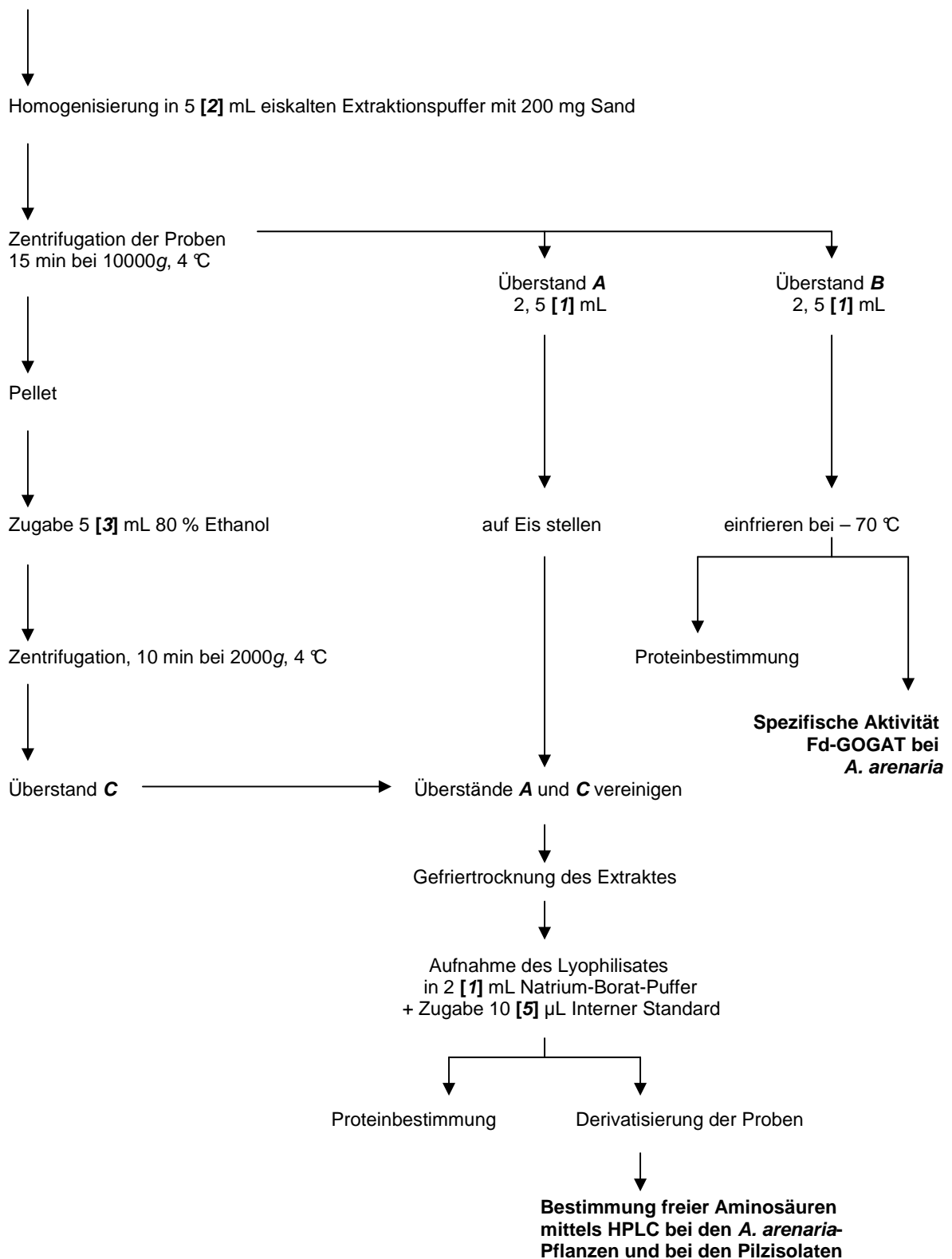


Abb. 2.6 Aufarbeitungsschema zur Extraktion und Bestimmung von freien Aminosäuren bei *A. arenaria* und den untersuchten Pilzisolaten sowie zur Untersuchung der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT bei den Strandhaferpflanzen (s. 2.7.3). Die Angaben für die Pilze wurden kursiv in Klammern aufgeschrieben. Einzelheiten s. 2.7.1.2.

2.7.1.3 Derivatisierung der Proben

Eine effiziente Methode zur Analyse von Aminosäuren stellt die Vorsäulenderivatisierung mit 9-Fluorenyloxycarbonylchlorid (FMOC) dar. FMOC reagiert schnell sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminosäuren und bildet intensiv fluoreszierende, bei Raumtemperatur über 30 h stabile Derivate. Da die quantitative Auswertung des Chromatogramms durch die Entstehung von Fluorenylalkohol (FMOC-OH) gestört werden könnte, muss das überschüssige FMOC durch die Zugabe von 1-Aminoadamantan (ADAM) in einem zweiten Schritt umgesetzt werden (Quelle: Applikationsservice der Fa. GROM, 1995).

Zur Derivatisierung der Proben mit FMOC wurde der gefriergetrocknete Extrakt in 2 mL 0,5 M Natrium-Borat-Puffer (pH 7,7) resuspendiert. 80 µL des Gemisches wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, danach erneut mit 80 µL Na-Borat-Puffer versetzt und gut vermischt. Darauf folgte die Zugabe von 40 µL des 1,5 mM FMOC-Reagenzes, kräftiges Schütteln für 45 s und anschließend das Umsetzen von überschüssigem FMOC durch Hinfügen von 200 µL 40 mM ADAM-Reagenz. Nach erneutem Schütteln für 45 s wurden der Probe 400 µL Elutionsmittel A zugegeben. Anschließend wurde die Probe innerhalb von 30 h in der HPLC vermessen.

Bei der Derivatisierung der Proben für die HPLC-Analytik fanden folgende Reagenzien und Lösungen Verwendung (GROM, 1995):

- 0,5 M **Natrium-Borat-Puffer**, pH 7,7:

3,09 g Borsäure wurden in 90 mL *aqua dest.* gelöst, der pH-Wert mit 30 %iger NaOH (w/v) auf pH 7,7 eingestellt und die Lösung auf 100 mL mit *aqua dest.* aufgefüllt

- **Elutionspuffer**: 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,2:

6 mL Essigsäure (100 %) wurden zu 1900 mL *aqua dest.* gegeben und der pH-Wert mit 30 % NaOH (w/v) auf pH 4,2 eingestellt. Der Puffer wurde mit *aqua dest.* auf 2000 mL aufgefüllt

- **Elutionsmittel A**: 800 mL Elutionspuffer + 200 mL Acetonitril

- **Elutionsmittel B**: 200 mL Elutionspuffer + 800 mL Acetonitril

- 1,5 mM **FMOC-Reagenz**:

19,5 mg von FMOC wurden in 50 mL Aceton gemischt und bei – 20 °C in einer dunklen Flasche aufbewahrt (Zersetzungsschutz)

- 40 mM **ADAM-Lösung**: 45,6 mg 1-Aminoadamantan-Chlorid wurden in 3 mL

Natrium-Borat-Puffer und 3 mL Aceton aufgenommen. Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt.

2.7.1.4 Das HPLC-System und Aminosäurenanalytik

Die Analyse von Aminosäuren wurde an einem HPLC-System vorgenommen, das sich aus einem Onlineentgaser (Techlab GmbH, Erkerode), Pumpe (Modell 220; Bischoff Chromatography, Leonberg), Autosampler (Basic-Marathon; Spark, Holland), Säulenofen (K4; Techlab GmbH, Erkerode) und einem Fluoreszenzdetektor (SFM-25; Kontron, Berlin) zusammensetzte. Der unterbrechungsfreien Onlinestromversorgung diente ein Spannungsstabilisator (Minute Man 2052L; Phoenixtec, USA).

30 µL der derivatisierten Probe wurden über den Autosampler auf die ODS (C18) HyperCloneTM- Säule (250 x 4,6 mm; Korngröße 5 µm) aufgetragen und bei einer Flussrate von 1 mL / min, einer Säulentemperatur von 40 °C und in einem Gradienten aufgetrennt (Tab. 2.4). Der Laufmittelgradient wurde mit einem Gradientenformer (Ecomat GF-200; Techlab GmbH, Erkerode) programmiert. Die Analyse der Aminosäuren erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregung von 263 nm und einer Emission von 310 nm. Die Chromatogramme wurden über einen PC mittels integrierter Software (Andromeda; Techlab GmbH, Erkerode) nach Abgleich mit den Referenzwerten (vgl. 2.7.1.6) analysiert (s. 3.4). Jede Probe wurde dabei dreimal aufgetrennt.

Tab. 2.4 Bedingungen der HPLC-Analyse von freien Aminosäuren, die mit folgendem Elutionsgradienten durchgeführt wurde:

- Eluent A: 80 % Elutionspuffer + 20 % Acetonitril
- Eluent B: 20 % Elutionspuffer + 20 % Acetonitril

Eluent [%]		Zeit [min]
<u>A</u>	<u>B</u>	
100	0	1
60	40	1 - 36
30	70	36 - 46
0	100	46 - 56
100	0	56 - 58 Äquilibrierung

2.7.1.5 Interner Standard

Um Verluste zu erfassen, die sich auf das Messergebnis auswirken könnten, wird üblicherweise sowohl während der Kalibrierung als auch bei dem Vermessen von Proben ein interner Standard mitbestimmt. Dabei handelt es sich um eine Substanz, die in den Proben nicht enthalten ist (WAGNER, 2002; MEYER, 2004). Für die Aminosäurenanalyse wurde die in der Natur nicht natürlich vorkommende Aminosäure Norvalin gewählt. Nach der Extraktion der Aminosäuren und der nachfolgenden Gefriertrocknung der Extrakte wurden die Lyophilisate in jeweils 2 mL Borat-Puffer aufgenommen (s. 2.7.1.2) und mit je

10 μL aus einer wässrigen 125 mM Norvalinstammlösung versetzt. Jeweils 80 μL der Proben wurden anschließend mit Fmoc derivatisiert (vgl. 2.7.1.3) und mit HPLC analysiert (s. 2.7.1.4). Die Norvalinendkonzentration in den zu vermessenden Proben betrug 25 μM .

2.7.1.6 Kalibrierung der Säule

Um die in den zu vermessenden Proben enthaltenen Aminosäuren zuzuordnen, wurden die Retentionszeiten von 17 Referenz-L-Aminosäuren ermittelt. Für die Messung wurde von jeder Referenzsubstanz eine 1 M Lösung in *aqua dest.* hergestellt und anschließend auf jeweils 100, 50, 20 und 10 μM verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 80 μL derivatisiert (s. 2.7.1.3), 30 μL in das HPLC-System injiziert und jeweils dreimal aufgetrennt. Anschließend erfolgten die Ermittlung von Retentionszeiten sowie die Ausrechnung von Peakflächen zur Erstellung von Kalibrierungsgeraden. Die zugehörigen Gleichungen der Kalibrierungsgeraden sind im Anhang D. 1 einzusehen.

Die Aufbewahrung von fertigen Aminosäurenlösungen fand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt.

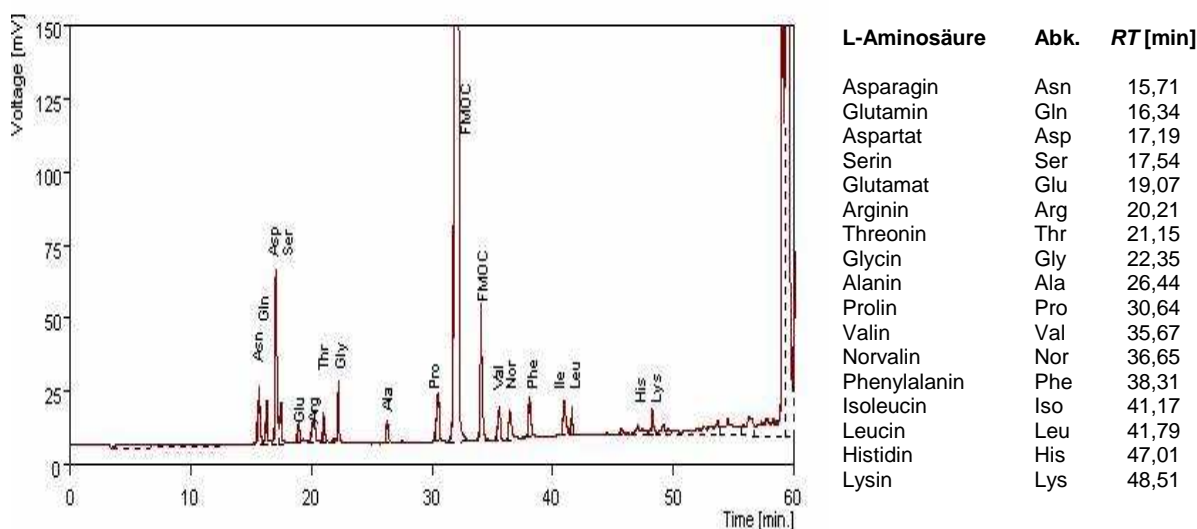


Abb. 2.7 HPLC-Chromatogramm mit Peaks, die den Retentionszeiten von 17 eingesetzten Referenz-L-Aminosäuren entsprechen. 30 μL des Gemisches von Standardsubstanzen (10 μM pro L-Aminosäure) wurden nach der Derivatisierung mit Fmoc in einem Laufmittelgradienten aufgetrennt (Laufbedingungen s. 2.7.1.4). Als interner Standard fungierte L-Norvalin (s. 2.7.1.5). Die in der Mitte des Chromatogramms erscheinenden Peaks stellen Reste des nicht umgesetzten Fmoc dar (Fluorenylalkohol; Fmoc-OH). Neben dem Chromatogramm befinden sich die Angaben zur vollständigen Aminosäurebezeichnungen, zu den in der Abbildung verwendeten Abkürzungen (Abk.) sowie die Retentionszeiten in min (RT).

Für die Erstellung eines Gesamtchromatogramms von allen eingesetzten Referenzstoffen (Abb. 2.7), wurde ein Gemisch aus 17 L-Aminosäuren vorbereitet (Endkonzentration pro Referenzsubstanz: 10 μM). Danach wurden 30 μL der derivatisierten Probe (s. 2.7.1.3) in

das HPLC-System injiziert und in einem Laufmittelgradienten aufgetrennt (vgl. 2.7.1.4). Als interner Standard fungierte L-Norvalin (s. 2.7.1.5).

2.7.1.7 Identifizierung von Peaks und Ausrechnen der Konzentrationen

Die Identifizierung von den eluierten Substanzen erfolgte generell über die Retentionszeiten. Konnten die Peaks nicht zugeordnet werden, wurden sie über das sog. „Spiken“ bestimmt. Bei diesem Verfahren wird der Probe ein definiertes Volumen eines Gemisches bekannter Standards zugegeben. Dies macht sich nach erneutem Vermessen in der Zunahme bestimmter Peakflächen bemerkbar. Die Veränderungen im Chromatogramm werden anschließend mit dem Chromatogramm ohne Zusatz verglichen und ausgewertet.

Die Erstellung von Kalibrierungsgeraden erfolgte durch die Auswertung von Peakflächen und diente anschließend zur Ausrechnung von Aminosäuregehalten in den Extrakten (s. 3.4).

2.7.2 Veränderungen im Zucker- und Zuckeralkoholpool

Weiterhin sollten mittels HPLC die Veränderungen im Zucker- und Polyolpool festgestellt werden, die bei Strandhafer auf den Salzstress und / oder Pilzbesiedlung zurückzuführen sind (s. 2.3.2 A, B und C).

2.7.2.1 HPLC-Analytik von Zuckern und Zuckeralkoholen bei *A. arenaria*

Das bei der Analytik von Zuckern- und Zuckeralkoholen verwendete Verfahren basiert auf der Ionenaustauschchromatographie. Das Prinzip dieser Methode beruht auf Wechselwirkungen zwischen dem Adsorbens, das „aktive Stellen“ trägt, mit den in der Nähe befindlichen Molekülen. Probemoleküle und Lösungsmittelmoleküle konkurrieren untereinander um die Adsorption. Eine stationäre Phase, die zum Ionenaustausch befähigt ist, trägt elektrische Ladungen an der Oberfläche. Die Ladungen sind durch bewegliche Gegenionen neutralisiert. Die mobile Phase enthält Ionen, und ionische Probemoleküle konkurrieren mit ihnen um einen Platz auf der Oberfläche der stationären Phase (MEYER, 2002). Zucker und Zuckeralkohole können mit Calcium und anderen Metallionen einen Komplex bilden (Ligandenaustausch). Deshalb wurde bei der Bestimmung ein Ca^{2+} -beladener Kationenaustauscher eingesetzt.

2.7.2.2 Extraktion von Zuckern und Zuckeralkoholen

Bei der Extraktion von Zuckern und Zuckeralkoholen (modifiziert nach GÖTZ, 1996 und WAGNER, 2002) wurden die lyophilisierten Pflanzen verwendet (s. 2.4). 50 mg des lyophilisierten Probenmaterials wurde in 3 mL 0,1 M TRIS-HCl-Extraktionspuffer (pH 7,4) mit 1 mM EGTA, 4 mM EDTA, 2,5 mM DTT und 0,1 % (v/v) Triton-X in einem Mörser über 2 min homogenisiert und für 10 min bei 4 °C und 100 000g zentrifugiert (2K15C, Sigma; Deutschland). Nach der Überführung von 100 µL vom Überstand A in ein 1,5 µL Reaktionsgefäß für die Proteinbestimmung (s. 2.7.5) und von restlichen 2,9 mL in ein 50 mL Reaktionsgefäß, erfolgte eine wässrige Extraktion des Pellets mit 5 mL sterilen Leitungswasser bei Raumtemperatur und für 3 min. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min und bei 3000g wurde der Überstand B in einem neuen 50 mL Reaktionsgefäß aufgesammelt und das Pellet mit 5 mL heißen 80 %igen (v/v) Ethanol für 3 min extrahiert. Nach einer Zentrifugation bei 3000g und für 10 min (Überstand C) wurde der Schritt der ethanolischen Extraktion sowie Zentrifugation exakt wiederholt (Überstand D). Anschließend erfolgte eine Vereinigung der Überstände A, B, C und D (Abb. 2.8). Die vereinigten Extrakte wurden für 2 h bei – 70 °C eingefroren, gefriergetrocknet (72 h), nach dem Lyophilisieren in 2 mL *aqua dest.* aufgenommen und in der HPLC vermessen (s. 2.7.2.3).

2.7.2.3 Das HPLC-System

Die Analyse von Zuckern und Zuckeralkoholen wurde an einem HPLC-System vorgenommen, das sich aus einer Pumpe (Jasco 880 PU; Jasco, Japan), Autosampler (Basic-Marathon; Spark, Holland), Säulenofen (K4; Techlab GmbH, Erkerode), Brechungsindexdetektor (RI 71; Showa Denko K., Japan) und einem Integrator (Chromatopac C-R6A; Shimadzu, Japan) zusammensetzte. Die Onlinestromversorgung gewährleistete ein Spannungsstabilisator (Minute Man 2052L; Phoenixtec, USA). Die Auftrennung der Proben erfolgte über eine Rezex- RCM- Monosaccharide Ca²⁺- Säule (300 x 7,8 mm; Partikelgröße 8 µm) bei einer Temperatur von 80 °C. Die Proben wurden mit filtriertem (Cellulose-Nitrat-Filter, Porengröße 0,45 µm; Sartorius, Göttingen) und entgastem *aqua dest.* bei einer konstanten Flussrate von 0,5 mL / min und unter isokratischen Bedingungen von der Säule eluiert.

Aufgrund dessen, dass die Kohlenhydratkonzentration mancher Proben sehr hoch war und somit die Auflösung von benachbarten Peaks in den HPLC-Chromatogrammen nicht möglich war, wurden die Proben mit *aqua dest.* in einem Verhältnis 1 : 5 verdünnt und erst dann vermessen. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Ausrechnung der Zucker- und Polyolgehalte berücksichtigt (s. 3.6).

Für die Bestimmung der Zucker- und Zuckeralkoholkonzentration in den Extrakten wurden 30 µL der in *aqua dest.* resuspendierten und entsprechend verdünnten Probe über den Autosampler auf die Säule aufgetragen. Die Analyse der Substanzen erfolgte mittels eines Brechungsindexdetektors. Die Chromatogramme wurden mit Hilfe eines Integrators aufgezeichnet und nach Abgleich mit Referenzwerten (s. 2.7.2.4) ausgewertet (s. 3.6). Jede Probe wurde dabei dreimal aufgetrennt.

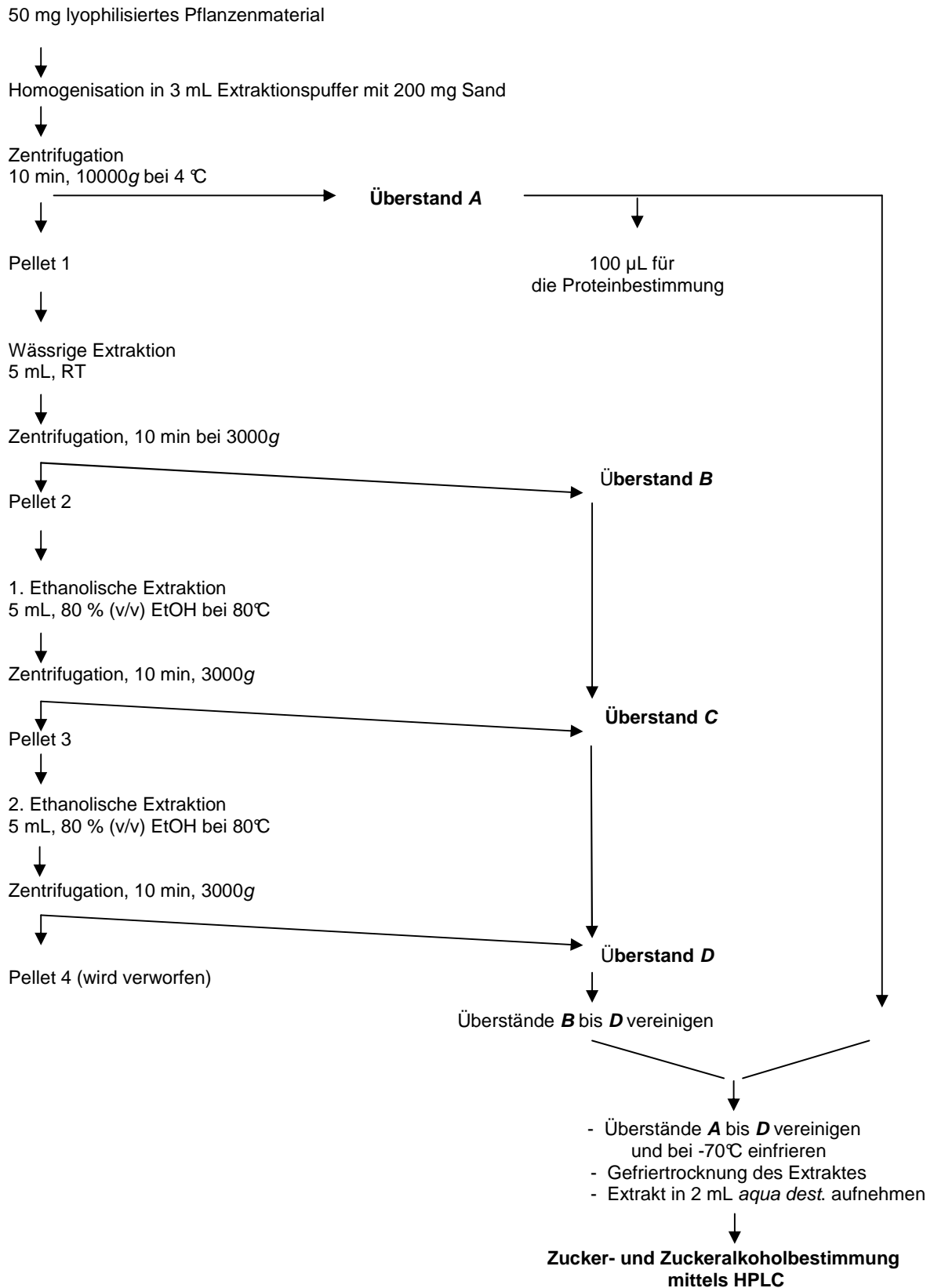


Abb. 2.8 Aufarbeitungsschema der Zucker- und Zuckeralkoholextraktion (modifiziert nach WAGNER, 2002). Einzelheiten s. 2.7.2.2.

2.7.2.4 Kalibrierung der Säule

Um die in den zu vermessenden Proben enthaltenen Zucker und Polyole detektieren zu können, wurden die Retentionszeiten von 8 Referenzsubstanzen ermittelt (s. Tab. 2.5). Für die Bestimmung wurden aus den in *aqua dest.* gelösten Kohlenhydraten (1 g/L) Verdünnungsreihen hergestellt, die jeweils 0,0625; 0,125 und 0,250 g/L der Referenzsubstanz enthielten. Die Proben wurden in das HPLC-System injiziert und jeweils dreimal aufgetrennt, wobei sowohl die Retentionszeiten ermittelt (Tab. 2.5 und Abb. 2.9) als auch die Peakflächen zur Erstellung von Kalibrierungsgeraden ausgerechnet wurden. Die zugehörigen Gleichungen der Kalibrierungsgeraden sind im Anhang D. 2 einzusehen.

Tab. 2.5 Die bei der Kalibrierung der Säule verwendete Referenzzucker und -Zuckeralkohole sowie ihre Retentionszeiten

Referenzsubstanz	Retentionszeit [min]
D-Saccharose	11,26
D-Glucose	13,42
D-Galactose	15,10
D-Fructose	16,05
D-Rybitol	17,90
D-Glycerol	19,38
D-Mannitol	20,78
D-Sorbitol	24,21

Für die Erstellung eines Gesamtchromatogramms von allen eingesetzten Referenzstoffen (Abb. 2.9) wurde ein Gemisch aus 8 Kohlenhydraten (Endkonzentration pro Referenzsubstanz: 0,1 g / L) vorbereitet, 30 µL davon in das HPLC-System injiziert und unter isokratischen Bedingungen aufgetrennt (vgl. 2.3.3.3).

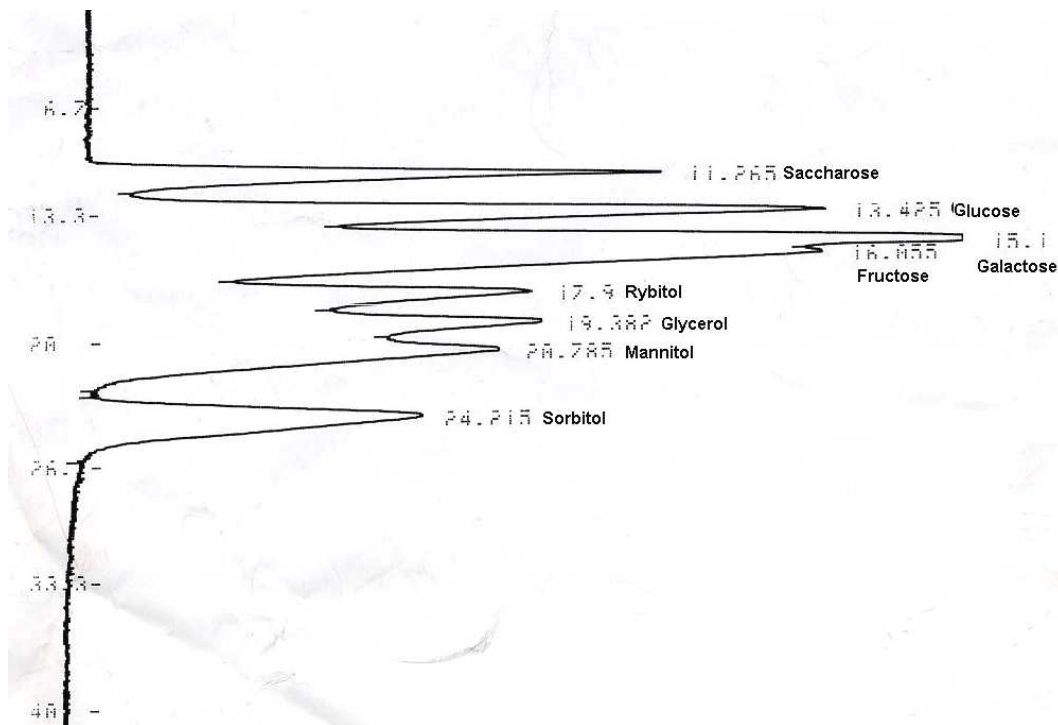


Abb. 2.9 HPLC-Chromatogramm mit Peaks, die den Retentionszeiten der 8 eingesetzten Referenzkohlenhydrate entsprechen. 30 µL des Kohlenhydratgemisches (0,1 g/L pro Referenzsubstanz) wurden in das HPLC injiziert und unter isokratischen Bedingungen aufgetrennt. Laufbedingungen siehe 2.7.2.3.

2.7.2.5 Identifizierung von Peaks und Ausrechnen der Konzentrationen

Die Identifizierung von Substanzen in Chromatogrammen sowie die Ausrechnung der Zucker- und Zuckeralkoholgehalte in den Extrakten erfolgte wie unter 2.7.1.7 beschrieben.

2.7.3 Bestimmung der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT

L-Glutamin und L-Glutamat fungieren sowohl in der mikrobiellen als auch in der pflanzlichen Zelle als Stickstofflieferanten für die Biosynthese von den meisten N-haltigen Verbindungen (z.B. anderen Aminosäuren, Nucleotiden, Chlorophyllen, Polyaminen und Alkaloiden) (VAN DEN HEUVEL *et al.* 2004). Ein wichtiges Enzym, das für die Ammoniumassimilation bei den Pflanzen zuständig ist, ist die Ferredoxin abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT; = Glutamat-Synthase; EC 1.4.7.1). Fd-GOGAT nimmt eine Schlüsselrolle im Glutamin-Synthetase / Glutamat-Synthase-Zyklus ein, wo L-Glutamat sowohl als der NH_4^+ - Akzeptor als auch das Produkt der Assimilation fungiert (MIFLIN & LEA, 1977; DINCTURCK & KNAFF, 2000; TOBIN & YAMAYA, 2001). Die Fd-GOGAT setzt dabei folgende Reaktion um:



Das reduzierte Ferredoxin, das als Elektronendonator fungiert, kann in *in vitro*-Assays durch reduziertes Methylviologen ersetzt werden, wenn dieses im Überschuss der Reaktion beigegeben wird (LEA & IRELAND, 1999; WAGNER, 2002). Diese Eigenschaft wurde auch im dargestellten Fd-GOGAT-Test ausgenutzt.

Für die Durchführung des Assays (nach WAGNER, 2002) wurden die Proben aus der Aminosäurenextraktion verwendet (vgl. 2.7.1.2). Mit 100 µL des Pflanzenextraktes erfolgte die Proteinbestimmung (s. 2.7.5). Pro Versuchsparallele (s. 2.3.1 A, B und C) wurden je dreimal 200 µL des Extraktes mit jeweils 150 µL der Substratlösung vermischt und die Reaktion unter Zugabe von 50 µL des Reduktanten gestartet. Nach vier Stunden Inkubation (30 °C im Dunkeln) erfolgte das Abstoppen der Umsetzung durch Erhitzen in einem Wasserbad (100 °C für 5 min). Nach dem Abzentrifugieren der Proben (5 min bei 3000g) wurden von jedem Ansatz 80 µL des Überstandes wie unter 2.7.1.3 derivatisiert und in einer 3fachen Bestimmung der Glutamatkonzentration in der HPLC vermessen (s. 2.7.1.4). Als Kontrolle diente ein reduktantfreier Ansatz.

Die Durchführung des Fd-GOGAT-Assays erfolgte unter Verwendung folgender Reagenzien:

Substratlösung:

in 0,1 M SÖRENSEN-Phosphat-Puffer (pH 7,5) wurden gelöst:

- 10 mM Oxoglutarat
- 10 mM L-Glutamin
- 15 mM Methylviologen

Reduktant:

- 14 mM Na₂S₂O₄ in 0,2 M NaHCO₃ in *aqua dest.*

Die Ermittlung der gebildeten L-Glutamatmenge wurde mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden für L-Glutamat durchgeführt (s. Anhang D. 1). Die Bestimmung der spezifischen Aktivität (A) von Fd-GOGAT erfolgte mit der unten angegebenen Formel und wurde als der Umsatz von 1 µM Substrat pro min (Unit; [U]), umgerechnet auf Proteinmenge [mg], definiert (s. 3.7):

$$A = (C_{\text{Glu}} / (\Delta t * C_{\text{Prot}})) * (V_E / V_X)$$

- A - spezifische Aktivität [U / mg]
 C_{Glu} - Konzentration der gebildeten L-Glutamatmenge – L-Glutamatkontrollwert [μM]
 C_{Prot} - Proteinkonzentration [mg / mL]
 Δt - Zeitintervall [min]
 V_E - Endvolumen der Probe [mL]
 V_X - Extraktvolumen in der Probe [mL]

2.7.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität von P5CS

Die Untersuchung der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS) bei *A.arenaria* sollte Aufschlüsse über die spezifische Aktivität des Enzyms unter Salzstressbedingungen (s. 2.3.1 A) und / oder bei der Inokulierung von Strandhafer mit den Pilzisolaten liefern (s. 2.3.1 B und C). Gleichzeitig sollte die Biosynthese der bedeutenden osmoprotektiven Substanz L-Prolin ermittelt werden. Darüber hinaus sollte die Einwirkung von Salzstress auf die spezifische Aktivität von P5CS bei den Pilzisolaten (s. 2.6.2) untersucht werden.

Bei den Pflanzen führt der erste Schritt der *de novo* Prolinbiosynthese vom L-Glutamat direkt zu Glutamat-Semialdehyd und wird von einem bifunktionellen Enzym Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS; EC 2.7.2.11 und 1.2.1.41) katalysiert (HU *et al.* 1992; KISHOR *et al.* 1995; SAVOURE *et al.* 1995; YOSHIBA *et al.* 1997; FUJITA *et al.* 1998 und 2003), das die Eigenschaften von sowohl Glutamyl-Kinase (GK) als auch von L-Glutamyl-Phosphat-Reduktase (GPR) besitzt. Die beiden enzymatischen P5CS-Domänen korrespondieren dabei mit den ProA- und ProB-Proteinen von *E. coli* (HU *et al.* 1992) (s. 1.4.3.1).

Das bifunktionelle Enzym P5CS katalysiert folgende Schlüsselreaktion in der L-Prolinbiosynthese.



Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität von P5CS bei *A. arenaria* und bei den Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 wurde ein gekoppelter GK / GPR- Assay, modifiziert nach GARCIA RIOS *et al.* (1995) und FUJITA *et al.* (2003), verwendet. Hierfür wurden pro Versuchsparallele (s. 2.3.1) 50 mg des lyophilisierten Pflanzenmaterials mit 200 mg Sand in 3 mL bzw. des Pilzmaterials in 2 mL eiskalten Extraktionspuffer (0,1 M TRIS-HCl-Puffer, pH 7,5; 10 mM Mercaptoethanol (frisch zugesetzt), 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ und 1 mM PMSF) in einem vorgekühlten Mörser über 2

min homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min und bei 10000g (2K15C, SIGMA; Deutschland) wurden 100 µL des Überstandes für die Proteinbestimmung (2.7.5) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Pro Versuchsparallele standen für den Enzymassay drei mal 200 µL des Extraktes zur Verfügung.

Direkt vor der Durchführung des Enzymtests wurde aus den Testreagenzien (außer dem Pflanzenextrakt) ein Mastermix hergestellt (Tab. 2.6), dessen Menge der Anzahl der zu vermessenden Proben entsprach. Nachdem der Mastermix auf die 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf) verteilt wurde (jeweils 800 µL), wobei jede Probe 3fach bestimmt werden sollte, folgte die Zugabe von jeweils 200 µL des Extraktes und infolgedessen der Reaktionsstart. Die Umsetzung lief für 14 h und bei 37 °C ab. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Erhitzen der Proben für 5 min in einem Wasserbad (100 °C).

Die Reaktion, die einen ATP- und NADPH- abhängigen Umsatz von L-Glutamat zu Glutamat-Semialdehyd darstellt, wurde bei 340 nm spektrophotometrisch verfolgt und als NADPH-Absorptionsabnahme registriert.

Tab. 2.6 Substanzen, die bei dem gekoppeltem GK / GPR– Assay verwendet wurden. Angegeben sind die Konzentrationen der Stammlösungen, dem Ansatz beigemischte Mengen von Reagenzien sowie ihre Endkonzentrationen in den zu vermessenden Proben.

Substanz	Stammlösung [mM]	Pipettiermenge [µL]	Endkonzentration im Ansatz [mM]
Na-Glutamat	250	300	75
MgCl ₂ x 6H ₂ O	250	100	25
NADPH	10	40	0,4
ATP	50	100	5
TRIS-HCl; pH 7,5	100	260	100
Extrakt-Zugabe (Start der Reaktion)	-	200	-
Endvolumen	-	1000	-

Als Blindproben fungierten Ansätze, bei denen der Mastermix und der Extrakt getrennt inkubiert (14 h bei 37 °C) und erst nach dem Ablauf der Reaktion vereinigt wurden.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der P5CS in dem gekoppelten GK / GPR- Assay erfolgte mit der unten angegebenen Formel und wurde als der Umsatz von 1 µM Substrat pro Minute (U; Unit), umgerechnet auf die Proteinmenge [mg], definiert (s. 3.8). Der in der Gleichung eingesetzte molare Extinktionskoeffizient von NADPH beträgt 6178 [L / (mol * cm)].

$$A = (\Delta E / (\epsilon_{\text{mol}} * d * \Delta t * C_{\text{Prot}})) * (V_E / V_X)$$

A - spezifische Aktivität [U / mg]

ϵ_{mol} - molarer Extinktionskoeffizient [L / (mol * cm)]

ΔE - Extinktionsdifferenz

d - Schichtdicke [cm]

Δt - Zeitintervall [min]

C_{Prot} - Proteinkonzentration [mg / mL]

V_E - Endvolumen der Probe [mL]

V_X - Extraktvolumen in der Probe [mL]

2.7.5 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) beruht auf einem Wechsel der roten Anionenformen des Triphenylfarbstoffes Serva Blau G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) nach spezifischen Bindungen der SO_3^{2-} -Gruppen im alkalischen Milieu an kationische und nicht polare, hydrophobe Seitenketten der Proteine zu einem blauen Farbstoff-Komplex. Dieser kann photometrisch bei 595 nm bestimmt werden (BRADFORD, 1976).

Für die Bradfordreagenz-Herstellung wurden 40 mg des Farbstoffes Serva Blau G-250 in 50 mL Ethanol absolut und 100 mL 85 %iger Orthophosphorsäure unter Rühren gelöst, mit *aqua dest.* auf 1000 mL aufgefüllt und dreimal über einen Papierfilter in eine dunkle Flasche abfiltriert. Das hergestellte Reagenz war dann bei 4 °C für maximal 6 Monate haltbar. Die Kalibrierungsgerade für die Berechnung der Proteinmenge wurde mit Rinderserumalbumin (Stammlösung 0,1 mg/mL in 0,3 M NaOH) im Bereich von 0 bis 100 µg erstellt (s. Anhang D. 3).

Für die Proteinbestimmung wurden 100 µL des Extraktes mit 1 mL des Bradfordreagenzes versetzt, gut gemischt und innerhalb von 15 min bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Als Blindwert diente ein proteinfreier Ansatz (100 µL 0,3 M NaOH mit 1 mL Bradford-Reagenz).

2.8 Molekularbiologische Untersuchungen

2.8.1 Identifizierung der Pilzisolat über 28S-rDNA- und ITS-Region

In der vorliegenden Arbeit wurde die Artbestimmung von den Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911, *F. culmorum* TUB6927, *M. bolleyi* TUB6930 und *G. graminis* TUB6935 u.a. über die Untersuchung der D2-Region von der großen ribosomalen Untereinheit (*large ribosomal unit*; *LSU*) sowie der interner transkribierender Spacer-Region (ITS1 und ITS2, 5.8S-rDNA mitinbegriffen) vorgenommen (s. 3.9.1).

2.8.1.1 DNA-Isolierung

Bei der DNA-Isolierung wurden 3 Wochen alte, auf festem KM-Medium (s. Tab. 2.1) angewachsene und bei RT inkubierte Pilzkulturen verwendet. Das Myzel wurde mittels einer sterilen Impföse entfernt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Durchführung der DNA-Extraktion erfolgte mit einem Ultra Clean DNA Isolierungskit (MoBio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA; USA) gemäß den Herstellerangaben. Die isolierte DNA wurde bei – 70 °C gelagert.

2.8.1.2 PCR-Bedingungen und Primer

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt in der molekularen Biologie eine unentbehrliche Technik dar, die eine Vervielfachung von DNA in kürzester Zeit erlaubt. Seit der Einführung der Methode in den 80er Jahren (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI *et al.* 1988) erfährt sie eine ständige Weiterentwicklung (WARD, 1994). In Anwesenheit von Desoxynucleotiden (dNTP's), MgCl₂, Template-DNA, Primern sowie unter Einsatz einer DNA-Polymerase (z.B. aus *Thermus aquaticus*; *Taq*-Polymerase) ermöglicht diese Methode eine *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen (BROCK *et al.* 2001).

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Whatman Biometra, GmbH; Göttingen) durchgeführt. Als Polymerase diente eine TaqBeadTM Hot Start Polymerase (1,25 U/bead), die wie die eingesetzten Reagenzien von Promega GmbH (Mannheim) bezogen wurde. Die Primer lieferte MWG Biotech AG (Ebersberg). Zu den PCR-Ansätzen wurden zugegeben: 5 µL DNA-Polymerasereaktionspuffer (10x; MgCl₂-frei), 1 µL dNTP's (10 mM), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 5 µL von jedem Primer (jeweils 10µM), 1 µL Template-DNA (alternativ cDNA; s. 2.8.3.7), 1,25 U/bead *Taq*-Polymerase sowie nucleasenfreies Wasser (UltraPureTM DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen GmbH; Karlsruhe) bis zum Endvolumen von 50 µL (ZUCCARO *et al.* 2003).

Die PCR-Bedingungen, unter denen die Amplifikation der 28S-rDNA- und der ITS-Region von den untersuchten Pilzisolaten mit jeweils 1 µL Template-DNA (s. 2.8.1.1.) durchgeführt wurde sowie die bei der Identifizierung eingesetzten Primer, sind der Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Tab. 2.7 Die PCR-Bedingungen sowie die Primer, die bei der Amplifikation von der 28S-rRNA- und ITS-Region der untersuchten Pilzisolat e eingesetzt wurden.

Amplifizierte Region	PCR-Bedingungen	Primer; T _m und Produktlänge (bp) (Sequenz-Angabe: 5'-3')	Autor
28S- rRNA	5min bei 95°C; danach 35 Zyklen von 30s bei 95°C, 45s bei 52°C, 1min bei 72°C und ein End-Elongationsschritt von 10min bei 72°C	NL912; T _m : 70,0°C TCAAATCCATCCGAGAACATCAG NL209; T _m : 72,2°C AAGCGCAGGAAAAGAAACCAACAG Produktlänge: 700 bp*	ZUCCARO <i>et al.</i> (2003)
ITS, 5.8S- rRNA	5min bei 95°C; danach 35 Zyklen von 1min bei 94°C, 1min bei 55°C, 1min bei 72°C und ein End-Elongationsschritt von 7min bei 72°C	ITS1-F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA ITS4 TCCTCCGCTATTGATATGC Produktlänge: ca. 500 bp	GARDES & BRUNS (1993) WHITE <i>et al.</i> (1990)

*bp - Basenpaare; ITS – interner transkribierender Spacer; T_m – Schmelztemperatur

2.8.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren

Jeweils 15 µL der PCR-Amplifikate aus 2.8.1.2 wurden zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist unter 3.9.1 und in der Abbildung 3.18 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1,2 bis 1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Nachdem die DNA (5 – 15 µL) in die Geltaschen gegeben wurde, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 1 x TRIS-Acetat-EDTA (TAE) - Puffer (1 L 50-fache Stammlösung: 242 g TRIS Base; 57,1 mL Eisessig; 100 mL 0,5 M EDTA; pH 8). Die angelegte Stromspannung betrug zwischen 90 und 120 mV. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (30 µL aus einer 10 mg/µL Stammlösung pro 1 L 1 x TAE-Puffer) für 30 min gefärbt, 20 min in 1 x TAE-Puffer entfärbt und anschließend dokumentiert.

2.8.1.4 Sequenzierung und Datenbankenanalyse

Nachdem die amplifizierten PCR-Fragmente (s. 2.8.1.2) der Pilisolate gereinigt wurden, um eine hochreine DNA zu bekommen (GEN-CLEAN III Kit, Qiogene; Heidelberg), erfolgte eine Direktsequenzierung durch die Firma AMODIA Bioservice GmbH (Braunschweig). Die Zuordnung von allen erhaltenen Sequenzen erfolgte unter Einsatz des BLAST-Programms (Version 2.2.13; National Center for Biotechnology Information; NCBI). Die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang I. 1 einzusehen.

2.8.2 Amplifikation der *PDH* von *A. arenaria*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expressionsregulation der Prolindehydrogenase von *Ammophila arenaria* (*AaPDH*) unter bzw. ohne Einwirkung von Salzstress sowie nach der Besiedlung der Pflanzen von den Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911 bzw. *F. culmorum* TUB6927 mittels semiquantitativer reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) untersucht (s. 2.8.3). Nach der Konstruktion von *AaPDH* spezifischer Primer (2.8.2.1), Amplifikation des Genfragmentes mittels PCR (2.8.2.4) sowie Klonierung der PCR-Produkte in einen Vektor (2.8.2.5) erfolgte die Sequenzierung der Klone (vgl. 2.8.2.9). Anschließend wurde die RT-PCR mit dem optimierten Primerpaar (s. 2.8.2.9) durchgeführt (s. 2.8.3). Die Kultivierung und Vorbereitung der Pflanzen für den Test erfolgte wie unter 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben.

2.8.2.1 Primerkonstruktion für die *AaPDH*- Amplifikation

Die Konstruktion von spezifischen Primern zur Amplifikation von *AaPDH* erfolgte nach einem Vergleich von expressed sequenced tags (EST's) (s. Tab. 2.8 und Anhang I. 5) von monokotyledonen Pflanzen, die als Ergebnis der BLAST-Suche (NCBI, Version 2.2.13) mit der zur Basis stehenden putativen Prolinoxidase aus *O. sativa* (cv. „Japonica“; GenBank accession number NM197664) zustande kamen (s. Anhang J. 3). Basierend auf Homologien zwischen den erhaltenen Sequenzen erfolgte die Gestaltung von spezifischen *AaPDH*-Oligonucleotiden (mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. ALGA ZUCCARO; vgl. Tab. 2.9).

Tab. 2.8 Die Pflanzenarten sowie die GenBank accession Nummern von EST's - Sequenzen, die zur Konstruktion von den Primern für die *AaPDH* - Amplifikation herangezogen wurden. Die Ergebnisse stellen Resultate der BLAST-Suche in den NCBI-Datenbanken dar, die auf Basis der putativen Prolinoxidasesequenz (GenBank accession No. NM197664) aus *Oryza sativa* (grau markiert) durchgeführt wurde.

Pflanzenart	GenBank Accession No.
<i>Triticum aestivum</i>	CD930394
<i>Triticum aestivum</i>	CD913221
<i>Triticum aestivum</i>	CD881169
<i>Zea mays</i>	CO525802
<i>Zea mays</i>	CO533394
<i>Zea mays</i>	CO525803
<i>Zea mays</i>	CD573092
<i>Hordeum vulgare</i>	BQ765484
<i>Sorghum bicolor</i>	CN136042
<i>Oryza sativa</i>	NM197664

Ferner wurden die neu gebildeten Primer (s. Tab. 2.9) gemeinsam mit der Nucleotidsequenz der Prolinoxidase aus *O. sativa* (GenBank accession No. NM197664) in das GeneDoc-Programm (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) eingegeben und anschließend durch farbige Markierung der Oligonucleotidsequenzen die Positionierung der Primer innerhalb des *O. sativa* - Gens veranschaulicht (Abb. 2.10).

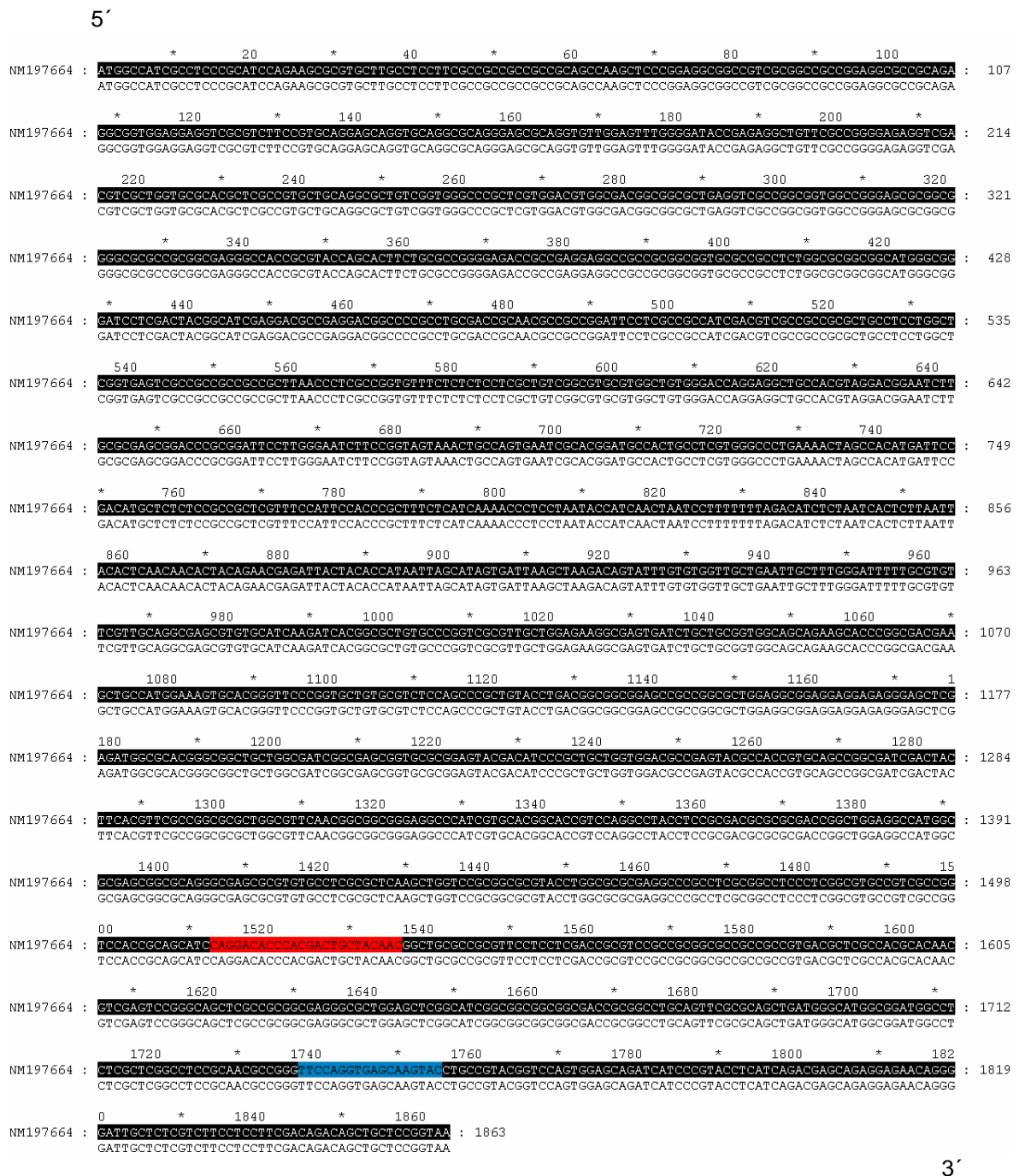


Abb. 2.10 Sequenz der putativen Prolinoxidase aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. NM197664) und die Positionierung von den neu konstruierten *AaPDH*-Primern. Die Fragmente mit den Positionen 1513 – 1536 bp (*GP 240*; rot markiert) und 1738 – 1755 bp (*GP 310*; blau markiert) wurden jeweils als *forward* und *reverse* Primer bei der Standard-PCR (s. 2.8.2.9) verwendet und ihre Sequenzen nach dem Klonieren optimiert (vgl. 2.8.2.10). Das Alignment wurde durchgeführt nach der manuellen Eingabe in das Programm GeneDoc (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997).

2.8.2.2 Homologie unter bekannten pflanzlichen PDH-Proteinsequenzen

Zur Untersuchung der Homologien unter den Prolindehydrogenasen aus monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen wurden die NCBI-Datenbanken nach bekannten pflanzlichen PDH-Proteinsequenzen durchsucht (vgl. 3.9.6) und diese

anschließend zu einem Alignment herangezogen (Abb. 2.11). Um zu überprüfen, in welchen Bereichen der Proteine sich die Primer anlagern, wurden die Basenabfolgen der neu gebildeten Oligonucleotide (s. 2.8.2.5) in die Proteinsequenzen übersetzt (GeneDoc-Programms, Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) und gleichermaßen dem Alignment unterzogen.

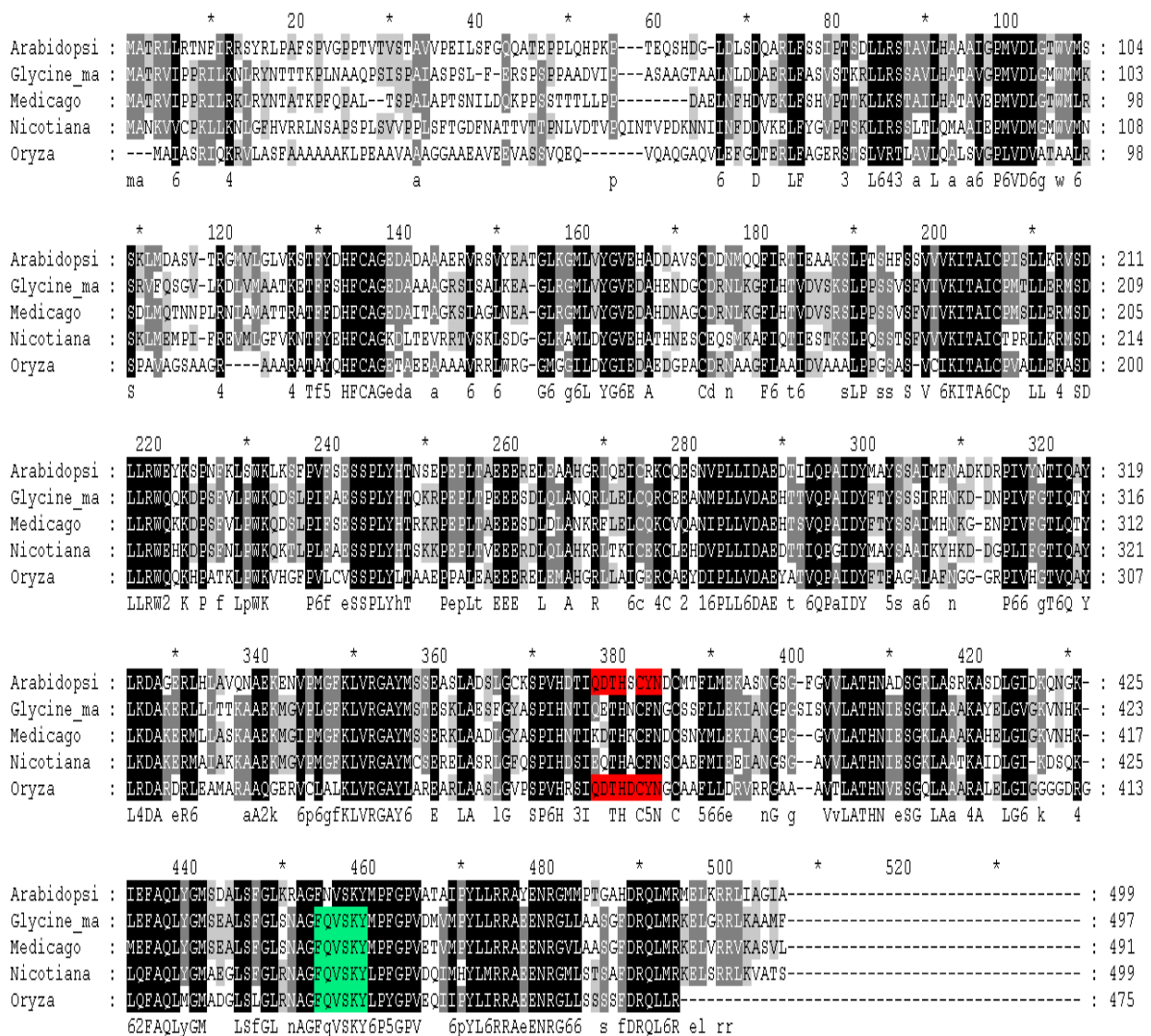


Abb. 2.11 Alignment von den Prolin dehydrogenase-Proteinsequenzen aus monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen zur Untersuchung von Homologien unter den Proteinen sowie zur Veranschaulichung von konservierten Regionen innerhalb der Sequenzen (schwarz markiert). Farblich markiert wurden Bereiche, in den sich die neu gebildeten und in die Proteinsequenzen übersetzten Primer positionieren. Rot markiert - der *forward* Primer GP240 (Positionen 377 – 384) sowie, grün markiert, der *reverse* Primer GP310 (Positionen 454 – 459).

2.8.2.3 DNA-Isolierung aus *A. arenaria*

Die DNA-Isolierung aus *A. arenaria* erfolgte mit einem FastDNA® SPIN Kit for Soil (BIO 101, Carlsbad; USA) gemäß den Herstellerangaben. Zehn axenisch angewachsene, drei Wochen alte Strandhaferpflanzen (s. 2.1.2 und 2.1.3) wurden in flüssigem Stickstoff zu

sehr feinem Pulver gemörsert und mit dem Kit extrahiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der extrahierten DNA in 50 µL nucleinsäurefreiem *aqua dest.* (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen GmbH; Karlsruhe). Die Lagerung der Nucleinsäuren fand bei – 70 °C statt. Die genomische DNA fungierte als Template bei der PCR-Durchführung (s. 2.8.2.5). Für die Kontrollversuche zur Spezifität der eingesetzten Primer fungierte die aus *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Col 0) isolierte DNA (s. 3.9.2.1). Die *A. thaliana*- Pflanzen wurden freundlicherweise von Herrn DR. FLORIAN BITTNER (Institut für Pflanzenbiologie; TU-Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die Extraktion erfolgte wie oben beschrieben, aus 500 mg Blattmaterial. Die isolierte Nucleinsäure wurde in 50 µL nucleinsäurefreiem *aqua dest.* (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen GmbH; Karlsruhe) aufgenommen.

2.8.2.4 Bedingungen der Amplifikation von *AaPDH*

Die PCR-Reaktion zur Amplifikation der *PDH*-Region bei *A. arenaria* wurde in einem Thermocycler (Whatman Biometra, GmbH; Göttingen) in 3 Parallelen durchgeführt. In den PCR-Vorversuchen (Gradienten-PCR mit verschiedenen Anlagerungstemperaturen für die Primer sowie die Amplifikation mit unterschiedlicher Anzahl der Zyklen) stellten sich die in der Tabelle 2.9 aufgeführten Bedingungen als optimal für die *AaPDH*-Amplifikation heraus.

Tab. 2.9 Sequenzen von den neuen Primern zur Amplifikation der *PDH*-Region bei *Ammophila arenaria* sowie die PCR-Bedingungen

Primerpaar und Produktlänge (bp) (Sequenz-Angabe: 5' - 3')	T _m [°C]	PCR-Bedingungen
<u>GP240</u> CAGGAS*ACCCACGACTGCTACAAC <u>GP310</u> GTACTTGCTCACCTGGAA Produktlänge: 243 bp	66,1 53,7	5min bei 95°C; danach 30 Zyklen von 30s bei 95°C, 55s bei 55°C, 30s bei 72°C und ein End- Elongationsschritt von 10min bei 72°C

bp – Basenpaare; S* – an dieser Stelle kann entweder G oder C vorhanden sein, da der Primer degeneriert ist; T_m – Schmelztemperatur

Zu den PCR-Ansätzen wurden zugegeben: 5 µL DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10x; MgCl₂-frei), 1 µL dNTP's (10 mM), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 5 µL von jedem Primer (jeweils 10 µM), 1 µL Template-DNA, 1,25 U/bead *Taq*-Polymerase sowie nucleasenfreies Wasser (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen GmbH; Karlsruhe) bis zum Endvolumen von 50 µL. Als Negativkontrolle fungierte ein ohne Template-DNA vorbereiteter Ansatz. Jeweils 15 µL der PCR-Produkte wurden zur Kontrolle in einem 1,5

% (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.19). Darüber hinaus wurden die Amplifikate zur Aufkonzentrierung der DNA aufgereinigt (GEN-CLEAN III Kit, Qiogene; Heidelberg), die Ansätze danach vereint und anschließend für die Klonierung verwendet (s. 2.8.2.5).

2.8.2.5 Direkte Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von den PCR Produkten sollte eine Information über die genaue Sequenz des mit dem neuen Primerpaar (GP240 - GP310) amplifizierten Genfragmentes liefern. Die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem TA Cloning[®] Kit und mit dem pCR[®] 2.1 - Vektor (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Kit wird die Fähigkeit der *Taq*-Polymerase ausgenutzt, eine Kette aus einzelnen Deoxyadenosinen (A) am 3'-Ende des PCR-Produktes anzuhängen. Der in linealisierte Form vorliegende Vektor besitzt dagegen an seinem 3'-Ende einen Deoxythymidin- (T)-Überhang, der eine Ligation des Amplifikats in den Vektor ermöglicht. Um die zu klonierende DNA mit dem linealisierten Vektor zu verknüpfen wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Für die spätere Selektion stand die Ampicillinresistenz des pCR[®] 2.1-Vektors zur Verfügung.

Die Transformation wurde mit MRF' XL1 blue chemisch kompetenten *E. coli* - Zellen durchgeführt (freundlicherweise von Herrn DR. JÖRN PETERSEN zur Verfügung gestellt). Die Auswahl der erfolgreich transformierten Klone erfolgte durch Blauweißselektion. Diese beruht auf einer Unterbrechung des *lacZ*-Gens durch ein Insert (z.B. ein PCR-Produkt). Das Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase. Das α -Fragment bildet zusammen mit dem allein ebenfalls inaktiven ω -Fragment eine aktive β -Galactosidase. Der Umsatz von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid; Laktose-Analogon) zu Galaktose und einem blauen, unlöslichen Produkt (5-bromo-4-chloro-3-Indoxol) zeigt die Genexpression von *lacZ* an, wodurch es zu einer Blaufärbung der Kolonien kommt. Die Transkription des *lacZ*-Gens lässt sich durch Isopropylthiogalactosid (IPTG), einem nicht abbaubaren Substratanalogon, induzieren. Durch Einbringen von Fremd-DNA wird der Leserahmen des *lacZ* α -Peptid-Gens zerstört, sodass die Spaltung von X-Gal unterbleibt und die rekombinanten *E. coli* - Kolonien weiß bleiben (MÜLHARDT, 2002).

Die Blauweißselektion erfolgte durch das Ausplattieren der Transformanten auf festem Luria Broth (LB) - Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und jeweils 40 μ L von 40 μ g/mL X-Gal sowie 100 mM IPTG. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die weißen Kolonien ausselektiert und jeweils eine davon in ein mit 5 mL LB-Medium (versetzt mit 100 μ g/mL Ampicillin) gefülltes Röhrchen gebracht. Nach einer Kultivierung der Röhrchen

auf einem Schüttler (120 rpm) über Nacht und bei 37 °C erfolgte die Plasmidpräparation (2.8.2.6).

Das LB-Medium setzte sich aus Trypton (10 g), Hefeextrakt (5 g) und NaCl (10 g) zusammen. Die Substanzen wurden mit *aqua dest.* auf 1000 mL aufgefüllt. Der pH-Wert des Mediums betrug 7,5. LB-Agarplatten wurden aus LB-Medium hergestellt, dem 15 g/L Agar zugesetzt wurden.

2.8.2.6 Plasmid-DNA-Präparation

Für die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein erweitertes Protokoll der alkalischen Lyse nach einer Labormethode verwendet (modifiziert nach Dr. J. Petersen; persönliche Mitteilung):

1. Überführen von 2,5 µL von jeder Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Verwerfen des Überstandes und erneute Zugabe von 1,5 µL der Übernachtskultur zum Pellet. Zentrifugation wie oben.
2. Quantitative Entfernung des Restmediums und anschließend Zugabe von 100 µL von Lösung A. Ruhen der Proben für 5 min bei RT (Resuspendierung)
3. Zugabe von 200 µL Lösung B, kurzes Umschütteln. Ruhen auf Eis für 5 min (Denaturierung).
4. Zugabe von 150 µL Lösung C, kurzes Mischen, Ruhen auf Eis für 5 min (Neutralisierung) und Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm (Überstand enthält Plasmid-DNA).
5. Überführen von 380 µL Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (auf Eis) und Hinfügen von 380 µL Lösung D. Ruhen auf Eis für 15 min.
6. Zentrifugation der Proben über 1 min bei 13.000 rpm.
7. Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe von 500 µL Isopropanol.
8. Fällung der Plasmid-DNA für 10 min bei – 20 °C.
9. Zentrifugation über 10 min bei 13.000 rpm; Verwerfen des Überstandes.
10. Waschen des Pellets (enthält Plasmid-DNA) mit 300 µL 70 % (v/v) Ethanol und Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min. Vollständiges Abziehen des Überstandes und Trocknen des Pellets für einige Minuten (RT).
11. Aufnahme des Pellets in 50 µL TRIS-EDTA-Puffer (TE) versetzt mit einer RNase (20 mg/ml) (Invitrogen)
12. Überführen von 3 µL der Lösung in ein neues Reaktionsgefäß (Kontrollverdau)

Bei der Plasmid-DNA Präparation verwendete Lösungen:

Lösung A	25 mM Tris-HCl; pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
Lösung B	0,2 mM NaOH 1 % w/v SDS
Lösung C	28,5 mL H ₂ O 60 mL 5 M KAc 11,5 mL Essigsäure; min. 99 % v/v
Lösung D	7,5 M NH ₄ Ac
TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.8.2.7 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA und Insertkontrolle

Zur Überprüfung der DNA-Qualität, Menge und Insertgröße, wurden jeweils 3 µL der Plasmid-DNA mit einer geeigneten Restriktionsendonuclease (hier EcoRI, 10U; Invitrogen, Karlsruhe) bei 37 °C für 2 h gespalten. 3 µL der Plasmid-DNA wurden hierfür mit 2 µL Puffer „H“ (10x), 0,5 µL Enzym und in 14,5 µL nucleasenfreien Wasser aufgenommen (Endvolumen 20 µl). Jeweils 15 µL der verdauten Plasmid-DNA wurden nach der Spaltung zur Kontrolle des Restriktionsverdaus auf ein 1,2 %iges (w/v) Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 3.20).

2.8.2.8 PCR-Reaktion mit der Plasmid-DNA

Die Überprüfung, welche der Plasmide mit den eingebauten Inserts ein mit dem neuen Primerpaar GP240 – GP310 amplifizierbares Produkt liefern, erfolgte mittels einer PCR (s. Tab. 2.9). Die Reaktion wurde mit jeweils 1 µL der Plasmid-DNA als Template durchgeführt (Vorbereitung der Ansätze – vgl. 2.8.1.2). Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,2 %igem (w/v) Agarosegel (aufgetragen jeweils 15 µL des PCR-Produktes) (s. Abb. 3.21).

2.8.2.9 DNA-Sequenzanalyse und Primeroptimierung

Plasmide, die ein PCR-Produkt lieferten (s. 3.9.2.2) wurden von der Firma AMODIA Bioservice GmbH (Braunschweig) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen, die einen Teil des Prolindehydrogenasegens von *A. arenaria* repräsentieren sollten, wurden u.a. bei der BLAST-Suche eingesetzt, um die Homologien zu den schon publizierten Sequenzen von anderen monokotyledonen Pflanzen festzustellen (s. 3.9.2.3). Sie wurden ebenso zur Optimierung der unter 2.8.2.4 beschriebenen Primer verwendet. Hierfür wurden die

Sequenzen der Klone 1, 2, 6 und 7 (s. Tab. 3.4) sowie die Sequenz der Prolinoxidase aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. NM197664; s. Anhang I. 3), in das GeneDoc-Programm (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) eingegeben und die Primer GP240 und GP310 nach der Auswertung entsprechend modifiziert, dass sie mit den Sequenzen der Klone übereinstimmten (s. 3.9.2.4 und Abb. 3.23).

2.8.3 Untersuchungen zur Regulation der Genexpression von *AaPDH* mittels semiquantitativer reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der reversen Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) nutzt man die Fähigkeit der reversen Transkriptase, in Gegenwart eines geeigneten 3'-Primers entlang einer mRNA-Matrize eine einzelsträngige DNA-Kopie zu synthetisieren. Diese kann in einer nachfolgenden PCR, der RT-PCR, amplifiziert werden und man erhält die intronfreie Sequenz der das Protein codierenden mRNA, repräsentiert durch die doppelsträngige cDNA (BITTNER, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der Prolindehydrogenase aus *A. arenaria* mit und ohne Salzstresseinwirkung, bzw. nach der Inokulierung der Pflanzen mit den Pilzisolaten, untersucht (s. 2.3.1 und 2.3.2). Eine geeignete Methode hierfür stellt die semiquantitative reverse Transkriptase PCR (semi-RT-PCR) dar. Die spezifische Genexpression kann durch die Ermittlung der mRNA-Menge festgestellt werden und somit eine Aussage über den Transkriptionsstatus der Zelle liefern (HAN & SEMRU, 2004). Unter Einsatz von externen Standardgenen (z.B. *β-Tubulin* oder *Actin*; vgl. 2.8.3.5) ist es möglich, auf die Expressionsunterschiede zwischen den Target- und Referenzgenen zu schließen und somit eine semiquantitative Aussage über den Transkriptionsstatus zu erhalten.

Zur Durchführung wurden Proben mit jeweils identischer Menge der Pflanzen-RNA (s. 2.8.3.2) mit Hilfe einer reversen Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV) (Promega GmbH; Mannheim) in die cDNA umgeschrieben (s. 2.8.3.4) und danach in den RT-PCR-Reaktionen mit geeigneten Primern für das Zielgen (hier *AaPDH*) sowie externe Standardgene (hier *housekeeping genes* für *β-Tubulin* und *18S-rRNA*; s. 2.8.3.6 und 2.8.3.7) amplifiziert. Danach erfolgte die Auftrennung von den PCR-Produkten in einem Agarosegel (s. 2.8.3.7). Für die Semiquantifizierung wurde die Ausprägung der Gelbanden von den *AaPDH*-Produkten mit den Amplifikaten der Referenzgene (*β-Tubulin* und *18S-rRNA*) verglichen (s. 3.9.4 und Abb. 3.24).

2.8.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die zelluläre RNA einer höheren Pflanze besteht aus ribosomaler (rRNA), Transfer (tRNA) und messenger (mRNA), wobei die rRNA den größten Teil ausmacht (85 – 90 %). Cytoplasma, Plastiden und Mitochondrien enthalten ihre eigene RNA-Population (BRADY, 1988).

Die Gesamt-RNA-Extraktion aus *A. arenaria* erfolgte mit dem RNAwiz™ Kit (Ambion; UK) (1ml RNAwiz™ Kit / 100 mg Pflanzengewebe). Dafür wurden frisch geerntete und bei – 70 °C eingefrorene Pflanzen in flüssigem Stickstoff zu sehr feinem Pulver homogenisiert, in Reaktionsgefäße überführt und die RNA gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Pro Versuch (vgl. 2.3.1 D und 2.3.2) wurden jeweils 300 mg Pflanzenmaterial in drei Parallelen bearbeitet. Nach dem Extraktionsvorgang erfolgte das Trocknen der Nucleinsäuren bei RT und die Aufnahme in 10 µL Ultra pure DNase und RNase freiem *aqua dest.* (Invitrogen; Karlsruhe). Die Extrakte aus der gleichen Versuchsreihe wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt (jeweils 3-mal 10 µL) und anschließend deren RNA-Gehalt photometrisch bestimmt (2.8.3.2).

2.8.3.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wird bei drei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt: 230, 260 und 280 nm. Nur die Wellenlänge von 260 nm liefert eine Information über den Nucleinsäuregehalt. Eine optische Dichte (OD) von 1 steht dabei für 40 µg/mL RNA oder 50 µg/mL DNA, wobei zwischen den beiden Nucleinsäurearten nicht unterschieden wird. Aus dem Verhältnis von OD_{260nm} zu OD_{280nm} sowie OD_{260nm} zu OD_{230nm} kann auf Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Polysacchariden geschlossen werden. Der Quotient aus OD_{260nm} zu OD_{280nm} sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen, wird jedoch stark vom pH-Wert sowie Salzgehalt der Probe beeinflusst (MÜLHARDT, 2002).

Für die Bestimmung des RNA-Gehaltes wurden jeweils 5 µL der isolierten Nucleinsäure in 1000 µL DNase und RNase freiem *aqua dest.* aufgenommen und pro Probe in einer 2fachen Bestimmung photometrisch vermessen (s. Anhang L). Die RNA-Ausbeute betrug zwischen 2 - 5 µg / µL.

Für die Durchführung der RT-PCR wurde der RNA-Gehalt jeder Probe auf 10 µg in 20 µL DNase und RNase freiem *aqua dest.* eingestellt. Anschließend, um die Verunreinigungen mit der genomischen DNA zu vermeiden, erfolgte der DNase-Verdau (s. 2.8.3.3).

2.8.3.3 DNase-Verdau

Aus der Probe mit 10 µg RNA in 20 µL *aqua dest.* (siehe 2.8.3.2) wurden 8 µL entnommen (entspricht 4 µg RNA) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zugabe von 4 µL DNase und RNase freiem *aqua dest.*, 4 µL einer RQ1 RNase freien DNase (1 U/µL; Promega, Mannheim), 2 µL 10x DNase Puffer und Inkubation des Ansatzes bei 37 °C für 30 min. Danach erfolgte das Abstoppen der DNase-Aktivität durch Hinfügen von 2 µL einer Stopplösung (Promega, Mannheim). Mit der anschließenden Inkubation der Probe über 3 min und auf Eis wurde der DNA-Verdau beendet.

10 µL der DNase behandelten Probe (2 µg RNA) wurden bei der reversen Transkription (s. 2.8.3.4) eingesetzt.

2.8.3.4 Reverse Transkription

- Für die Durchführung der reversen Transkription wurden in einem 1,5 µL Reaktionsgefäß 10 µL der DNase-Verdauung (2 µg RNA) mit 2 µL Oligo(dt)₁₅ – Primer (20 µg, 0,5 µg/µL; Promega) versetzt und für 5 min bei 65 °C erhitzt (Anlagerung des Primers). Anschließend wurde die Reaktion für 5 min auf Eis gestellt und danach kurz abzentrifugiert.
- In einem anderen Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien zusammengefügt: 4 µL 5x AMV-Puffer (10 U/µL), 4 µL dNTP-Mix (10 mM; Promega), 0,5 µL RNase-Inhibitor (RNasin® 40 U/µL; Promega) und 1 µL AMV reverse Transkriptase (10 U/µL; Promega).
- Der Inhalt beider Gefäße wurde vereinigt und 2 h bei 41 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 225 µL TE-Puffer (s. 2.8.2.7) und damit das Abstoppen der Reaktion.
- Der reverse Transkription-Ansatz wurde bei 4 °C gelagert.

2.8.3.5 *Housekeeping genes* (Haushaltsgene) als externer Standard

Die Quantifizierung von physiologischen Genexpressionsänderungen erfordert eine Konfrontation zwischen der relativen Expression von Zielgenen und einem externen Standard. Von diesem nimmt man an, dass er in den untersuchten Ansätzen unabhängig von den Kultivierungsbedingungen unverändert exprimiert wird (MÜHLHARDT, 2002; NICOT *et al.* 2005). Häufig wählt man als Standards so genannte *housekeeping genes*, die durch äußere Einflüsse nicht reguliert werden (KIM *et al.* 2003). Zu den oft eingesetzten *housekeeping genes* gehören z.B. Actin, β-Tubulin, ribosomale Gene (18S- und 28S-rRNA), Cyclophilin, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder der Elongationsfaktor 1-α (KIM *et al.* 2003; NICOT *et al.* 2005). Grundsätzlich gilt jedoch, das

auch *housekeeping genes* in einem gewissen Maße herauf- und herunterreguliert werden und somit die Auswertung erschwert werden kann (MÜHLHARDT, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene für β -Tubulin sowie 18S-rRNA als externe Standards ausgewählt.

2.8.3.6 Primer für die Amplifikation der AaPDH- 18S-rRNA- und β -Tubulin-Region

Bei der RT-PCR-Durchführung erfolgte die Amplifikation der AaPDH-Region mit dem modifizierten Primerpaar GP240N – GP310N (s. 3.9.2.4 und Tab. 2.11). Die PCR-Reaktion mit dem Referenzgen 18S-rRNA wurde mit Primern durchgeführt, die von KIM *et al.* 2003 stammen (Tab. 2.11). Sie basieren auf der Sequenz der 18S-rRNA aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. AF069218). Nach einer BLAST-Suche (Version 2.2.13; NCBI) von bekannten Nucleotidsequenzen der β -Tubuline aus den monokotyledonen Pflanzen wurden 9 von ihnen in das GeneDoc-Programm (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) eingegeben und untereinander verglichen. Das Alignment dieser Fragmente erlaubte die Bildung von Oligonucleotiden, die eine Amplifikation der β -Tubulin-Region bei *A. arenaria*, als zweiten externen Standard, ermöglichte (Abb. 2.12). Die GenBank accession Nummern der vorgefundenen Fragmente sind in der Tabelle 2.10 dargestellt und ihre Sequenzen im Anhang I. 6 einzusehen. Alle verwendeten Primer sowie die Bedingungen der RT-PCR sind der Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Tab. 2.10 Die Pflanzenarten sowie die GenBank accession Nummern von Nucleotidsequenzen, die zur Konstruktion von den Primern für die β -Tubulin-Amplifikation bei *A. arenaria* herangezogen wurden. Die Ergebnisse stellen Resultate der BLAST-Suche in den NCBI-Datenbanken dar.

Pflanzenart	GenBank accession Nummer
1. <i>Oryza sativa</i>	AB104732
2. <i>Oryza sativa</i>	L33263
3. <i>Oryza sativa</i>	X79367
4. <i>Oryza sativa</i>	D30717
5. <i>Triticum aestivum</i>	U76895
6. <i>Triticum aestivum</i>	U76744
7. <i>Eleusine indica</i>	AF059289
8. <i>Zea mays</i>	L10634
9. <i>Zea mays</i>	X74654
10. <i>Zea mays</i>	X52879



The Alignment wurde durchgeführt nach der manuellen Eingabe in das Programm GeneDoc (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.*, 1997).

Die RT-PCR-Reaktionen zur Amplifikation der *PDH*-, *18S-rRNA*- sowie *β-Tubulin*-Region bei *A. arenaria* wurden in einem Thermocycler (Whatman Biometra, GmbH; Göttingen) durchgeführt. Zu den Ansätzen wurden zugegeben: 5 µL DNA-Polymerasereaktionspuffer (10x; MgCl₂-frei), 1 µL dNTP's (10 mM), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 5 µL von jedem Primer (jeweils 10 µM), 1 µL Template-cDNA, 1,25 U/bead *Taq*-Polymerase sowie

nucleasenfrees Wasser (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen GmbH; Karlsruhe) bis zum Endvolumen von 50 µL. Bei der Vorbereitung der Positivkontrollansätze wurde an der Stelle von der cDNA die genomische DNA als Template verwendet. Die PCR wurde, außer für die Positivkontrollen, in jeweils zwei Parallelen durchgeführt. Die Bedingungen der RT-PCR-Reaktion sind der Tabelle 2.11 zu entnehmen. Die Amplifikate wurden zur Kontrolle, wie unter 2.8.1.3 beschrieben, auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.9.4 und Abb. 3.24).

Tab. 2.11 Sequenzen der Primer, die bei der Amplifikation der PDH- 18S-rRNA- und β -Tubulin-Region bei *A.arenaria* verwendet wurden sowie die RT-PCR-Bedingungen

Amplifizierte Region	PCR-Bedingungen	Primer und T _m (Sequenz-Angabe: 5' - 3')	Autor
<i>AaPDH</i>	5min bei 95°C; danach 40 Zyklen von 30s bei 95°C, 55s bei 55°C, 60s bei 72°C und ein End-Elongationsschritt von 10min bei 72°C	<u>GP240N</u> : T _m 66,1°C CAGGAGACCCACGACTGCTACAAC <u>GP310N</u> : T _m 67,8 °C GTACTTGCTCACCTGGAACCCGGC	PORADA <i>et al.</i> nicht veröffentlicht
18S-rRNA	5min bei 95°C; danach 30 Zyklen von 15s bei 94°C, 15s bei 57°C, 30s bei 72°C und ein End-Elongationsschritt von 5min bei 72°C	<u>18S for</u> : T _m 57,3°C ATGATAACTCGACGGATCGC <u>18S rev</u> : T _m 57,3°C CTTGATGTGGTAGCCGTTT	KIM <i>et al.</i> 2003
β -Tubulin	5min bei 95°C; danach 30 Zyklen von 30s bei 94°C, 55s bei 65°C, 30s bei 72°C und ein End-Elongationsschritt von 5min bei 72°C	<u>β-Tubulin for</u> : T _m 66,1°C AACCAGATCGGGGCCAAGTTCTGG <u>β-Tubulin rev</u> : T _m 67,7°C GCAGTCGCAGTTCTCGGCCTCC	PORADA <i>et al.</i> nicht veröffentlicht

T_m – Schmelztemperatur; *AaPDH* – Prolindehydrogenase aus *Ammophila arenaria*

2.8.3.8 Sequenzierung und Analyse des RT-PCR-Produktes

Um zu überprüfen, ob die mit dem Primerpaar GP240N – GP310N amplifizierte cDNA das richtige PCR-Produkt liefert, wurde das cDNA-Amplifikat aus 2.8.3.7 aufgereinigt (GEN-CLEAN III Kit, Qbiogene; Heidelberg) und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems). Die cDNA-Sequenz wurde anschließend mit den Datenbanken (NCBI) verglichen (s. Abb. 3.22) und einem Alignment mit den Sequenzen der *AaPDH*-Klone (s. Tab. 3.4) unterzogen (s. Abb. 3.26).

2.8.3.9 Amplifikation der genomischen DNA aus *A. arenaria* mit den 18S-rDNA- und β -Tubulinprimern sowie Sequenzierung und Datenbankenanalyse

Die Primer für die Amplifikation der 18S-rDNA- und β -Tubulin-Region von *A. arenaria* wurden zur Kontrolle in einer Standard-PCR-Reaktion eingesetzt (s. 2.8.3.7 und Tab. 2.11). Als Template fungierte jeweils 1 μ L der genomischen DNA aus Strandhafer (s. 2.8.2.4). Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,5 %igen Agarosegel (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.8.1.3) und dokumentiert (s. Abb. 3.25). Zusätzlich erfolgte die Aufreinigung von den Amplifikaten mit dem GEN-CLEAN III Kit (Qbiogene; Heidelberg) gemäß den Herstellerangaben und ihre Sequenzierung (s. 2.8.3.8). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den NCBI-Datenbanken verglichen (BLAST; Version 2.2.13) bzw. einem Alignment mit den bekannten Sequenzen aus monokotyledonen Pflanzen unterzogen (s. 3.9.6 und 3.9.6.2 sowie Anhang I. 6 und J. 7).

2.9. Statistische Analyse

Die Ausrechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Korrelationen wurde mit dem Excel-Programm (Microsoft®, 2002) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des SIGMASTAT-Programms (Version 3.1.1; SYSTAT, Germany). Die Analyse wurde mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Multiple Mittelwertvergleiche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ erfolgten dabei mittels der Holm-Sidak-Methode.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von pathogenen und endophytischen mit *Ammophila arenaria* assoziierten Pilzen auf salzgestresste Strandhaferpflanzen ermittelt. Die Durchführung der Experimente mit den Pflanzen erfolgte in zwei Teilen. In den **Langzeitversuchen** wurde *A. arenaria* Salzstress unterzogen und / oder mit Pilzisolaten inokuliert. Dabei wurden ausgewählte Parameter des pflanzlichen Metabolismus untersucht (Biotrockenmasse, Aminosäuren-, Zucker- und Polyolpool, spezifische Aktivitäten der Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase und Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase sowie die Regulation der Expression der Prolindehydrogenase).

Die **Kurzzeitversuche** dienten der Erforschung der Regulation der *AaPDH*-Expression bei Strandhafer.

Darüber hinaus wurden die ausgesuchten Pilzisolate in getrennten Versuchen auf die in Abhängigkeit von der Mediumsalinität gebildete Biomasse, auf ihr Besiedlungspotential und Wachstumsmodi innerhalb der Pflanzen, auf Salztoleranz sowie die Einwirkung vom NaCl-Stress auf diverse Parameter des Pilzmetabolismus (Aminosäurenpool und spezifische Aktivität von P5CS) hin untersucht.

Aufgrund der Fülle an Ergebnissen, die während der Untersuchungen angefallen sind, werden im vorliegenden Teil der Arbeit im Hinblick auf die ermittelten Resultate nur die wichtigsten dargestellt. Alle anderen bedeutungsvollen Daten sind im Anhang einzusehen.

3.1 Die aus *A. arenaria* isolierten Pilzisolate

3.1.1 Bilanz der Isolierung von den Pilzisolaten

113 Pilzisolate wurden aus dem Strandhafer isoliert, die zu den Erntezeitpunkten mit gesunden *A. arenaria*- Pflanzen assoziiert waren. 76 Stämme sind dabei aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften identifiziert (s. 2.2.1) und 19 verschiedenen Genera zugeordnet worden (Tab. 3.1). 37 Stämme erwiesen sich als mycelia sterilia, was eine Einteilung verhinderte. Die häufigsten Vertreter der isolierten Pilze gehörten den Gattungen *Fusarium* (15 %), *Microdochium* und *Phoma* (jeweils 11 %) sowie *Acremonium* (7 %) an. Das prozentuale Verhältnis der aus gesundem Strandhafer isolierten Gattungen ist in der Abbildung 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1 Genus bzw. Art, Herkunft sowie Anzahl der aus *A. arenaria* isolierten Pilzisolat

Pilz	Standort					
	Ahrenschoop OS ¹ 2002	Strande OS 2002	Nienhof NS ² 2003	Mandoe NS, DK ³ 2003	Schillig NS 2004	$\Sigma=113$
<i>Arthrimum</i> sp.			1			1
<i>Aspergillus</i> sp.					1	1
<i>Acremonium</i> spp.	1	3	3			7
<i>Alternaria</i> spp.		3				3
<i>Amarenographium metablasticum</i>					1	1
<i>Chaetomium</i> spp.			1	2		3
<i>Cladosporium</i> spp.		2	1	1		4
<i>Colletotrichum</i> sp.			1			1
<i>Conioscyphalaria</i> sp.				1		1
<i>Coniothyrium</i> sp.				1		1
<i>Epicoccum</i> spp.		3				3
<i>Fusarium</i> spp.		8	3	4		15
<i>Hormographiella verticillata</i>			1			1
<i>Microdochium</i> spp.		7	4			11
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	2					2
<i>Phialophora</i> spp.	2					2
<i>Phoma</i> spp.	7	4				11
<i>Rhizoctonia</i> sp.		1				1
<i>Ulocladium</i> spp.	4				2	6
Basidiomycet mycelia sterilia		1				1
	4	8	8		17	37
$\Sigma = 113$	20	40	23	9	21	113

OS – Ostsee, ²NS – Nordsee, ³DK – Dänemark

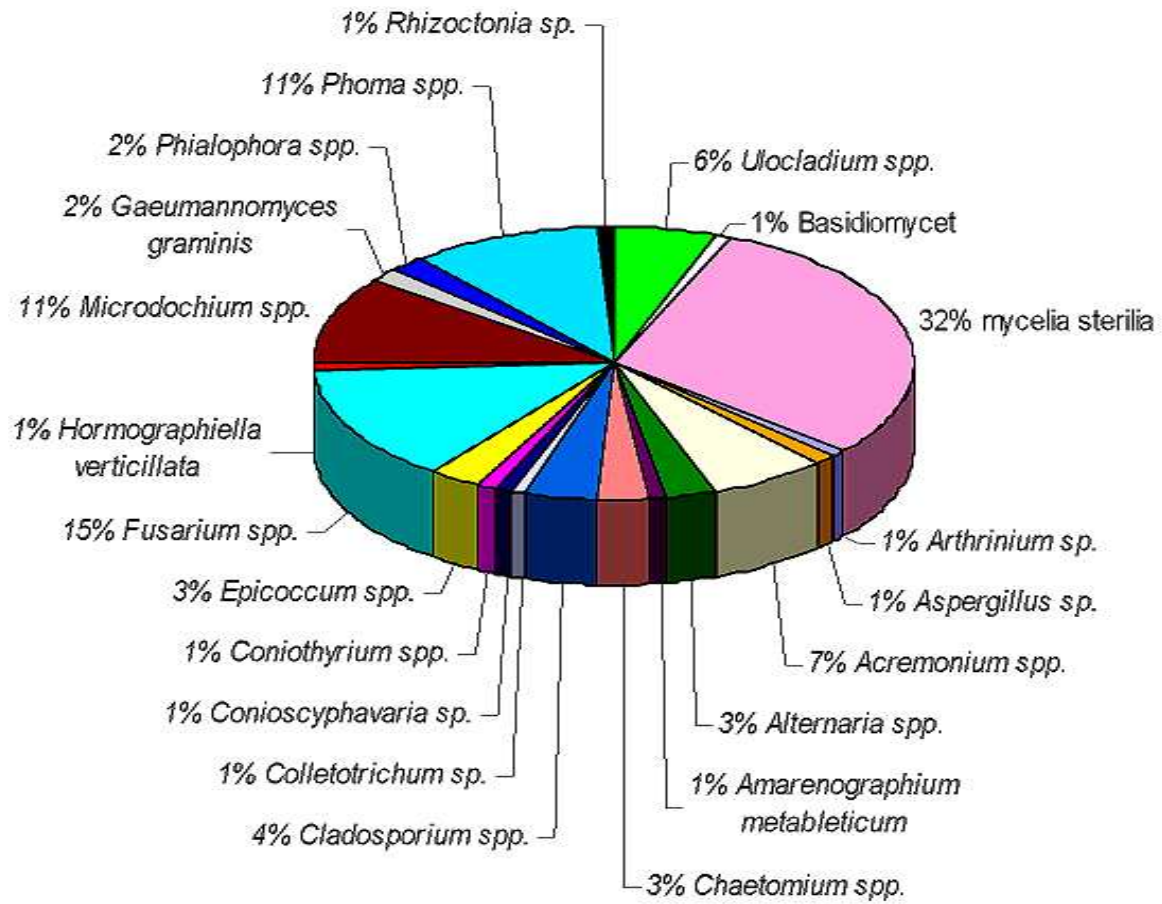


Abb. 3.1 Prozentuales Verhältnis von Pilzgattungen bzw. -Arten, die aus gesunden *A. arenaria*-Pflanzen isoliert wurden

3.1.2 Reinfektionsversuche und die Auswahl von Pilzisolaten für die weiteren Experimente

In den Reinfektionsversuchen (s. 2.2.2) wurde das Infektions- bzw. Besiedlungspotential der aus Strandhafer isolierten Stämme untersucht. Obwohl alle Stämme aus gesunden *A. arenaria*-Pflanzen isoliert wurden, zeigten sich nach der Versuchsauswertung 11 Isolate als pathogen (s. Tab. 3.2). Die besiedelten Pflanzen wiesen dabei nach vier Kultivierungswochen Nekrosen und Chlorosen sowie reduziertes Wachstum auf. 18 der Pilze verursachten keine Krankheitssymptome. Bei zehn der untersuchten Stämme konnte keine Aussage gemacht werden, da sie sich nicht reisolieren ließen.

Tab. 3.2 Pilzgattungen bzw. –Arten, die in die interne Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie (TUB) aufgenommen wurden sowie die zugehörigen Katalognummern und Herkunftsorte. Aufgeführt sind ebenfalls die Pflanzenteile, aus den die Pilze nach der Oberflächensterilisation isoliert wurden (*S* – Stängel, *B* – Blatt und *W* – Wurzel) sowie der Pilzstatus nach der Reinfektion (*RI*) (s. 2.2.2) (*p* – Pathogen; *e* – Endophyt, *nb* – nicht bestimmt). Gezeigt sind auch die Ergebnisse der Reinfektionsversuche (s. 2.2.2): (+) - Pilz aus dem Pflanzensegment reisoliert; (–) - Pilz aus dem Pflanzensegment nicht reisoliert. Die für die weiteren Versuche ausgewählten Pilzisolat *Acremonium strictum*, *Fusarium culmorum*, *Microdochium bolleyi* und *Gaeumannomyces graminis* wurden grau markiert.

TUB Katalog -Nr.	Pilzgattung	Herkunftsort	Pilz isoliert aus Pflanzenteil	Pilz- Status nach <i>RI</i>	Pilz reisoliert aus Segmentart:		
					Wurzel	Stängel	Blatt
6908	<i>Acremonium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6909	<i>Acremonium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6910	<i>Acremonium</i> sp.	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	+	+
6911	<i>Acremonium</i>	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>e</i>	+	+	+
6912	<i>Alternaria</i> sp.	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	-	-
6913	<i>Alternaria</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>e</i>	+	-	-
6914	<i>Alternaria</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6915	<i>Cladosporium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6916	<i>Cladosporium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6917	<i>Epicoccum</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6918	<i>Epicoccum</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6919	<i>Epicoccum</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6920	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	-	+
6921	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	+	-
6922	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>e</i>	+	+	+
6923	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>e</i>	+	+	-
6924	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>e</i>	+	+	-
6925	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>p</i>	-	-	+
6926	<i>Fusarium</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>p</i>	+	-	-
6927	<i>Fusarium</i>	Strande	<i>W</i>	<i>p</i>	+	+	+
6928	<i>Microdochium</i> sp.	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	-	+
6929	<i>Microdochium</i> sp.	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	+	-
6930	<i>Microdochium</i>	Strande	<i>S</i>	<i>e</i>	+	+	+
6931	<i>Microdochium</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>e</i>	+	+	+
6932	<i>Microdochium</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>e</i>	+	+	-
6933	<i>Microdochium</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>e</i>	+	+	+
6934	<i>Microdochium</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>e</i>	+	+	-
6935	<i>Gaeumannomyces</i>	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>p</i>	+	+	+
6936	<i>Phialophora</i> sp.	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6937	<i>Phialophora</i> sp.	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>nb</i>	-	-	-
6938	<i>Ulocladium</i> sp.	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>e</i>	+	+	+
6939	<i>Ulocladium</i> sp.	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>p</i>	-	-	+
6940	<i>Phoma</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>p</i>	+	+	+
6941	<i>Phoma</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>p</i>	+	+	+
6942	<i>Phoma</i> sp.	Strande	<i>B</i>	<i>p</i>	-	-	-
6943	<i>Phoma</i> sp.	Ahrenschoop	<i>W</i>	<i>p</i>	+	+	+
6944	<i>Phoma</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>p</i>	-	-	+
6945	<i>Basidiomycet</i>	Strande	<i>S</i>	<i>p</i>	+	-	+
6946	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Strande	<i>W</i>	<i>e</i>	-	+	-

Aus den 39 Pilzisolaten, die bei den Reinfektionsversuchen verwendet wurden, konnten 28 Stämme aus den ausgelegten Pflanzensegmenten reisoliert werden. 12 Isolate wuchsen dabei aus allen Segmentarten (Wurzel, Stängel und Blätter) aus (Tab. 3.2). Von

den letztgenannten Mikroorganismen wurden für die weiteren Pflanzenexperimente zwei Pilzisolat ausgewählt die asymptomatisch wuchsen (*Acremonium strictum* TUB6911 und *Microdochium bolleyi* TUB6930) sowie zwei, die Krankheitssymptome hervorriefen (*Fusarium culmorum* TUB6927 und *Gaeumannomyces graminis* TUB6935). Die Artbestimmung der vier Pilzisolat erfolgte u.a. über die Sequenzanalyse der 28S-*rDNA*- und *ITS*-Region (s. 2.8.1 und 3.9.1).

3.1.3 Wachstumsmodi der Pilzisolat im pflanzlichen Gewebe

Die Wachstumsmodi der Pilze im pflanzlichen Gewebe (s. 2.5.1) konnten aufgrund einer vermutlich geringen Besiedlungsdichte und einer unspezifischen Anfärbung nicht endgültig festgestellt werden. Diese Frage sollte daher in den Infektionsversuchen mit pflanzlichen Segmenten geklärt werden (s. 2.5.2). Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass zur Auswertung Pflanzenteile herangezogen werden mussten, die nicht mehr intakt waren. Aus diesem Grund konnten vermutlich die pflanzlichen Abwehrprozesse (z.B. hypersensitive Antwort, Produktion von Phytoalexinen, Synthese phenolhaltiger Substanzen wie phenolische Glukoside oder Glucoseester) (ISAAC, 1992), die bei der Infektion mit Pilzen eine wichtige Funktion haben, nicht mehr aktiviert werden. Dadurch konnten die Pilze ungehindert in das Gewebe eindringen. In der Abbildung 3.2 ist das intra- und interzelluläre Hyphenwachstum von *Ac. strictum* TUB6911 (A) und *G. graminis* TUB6935 (B) in den nicht mehr intakten Strandhafersegmenten dargestellt.

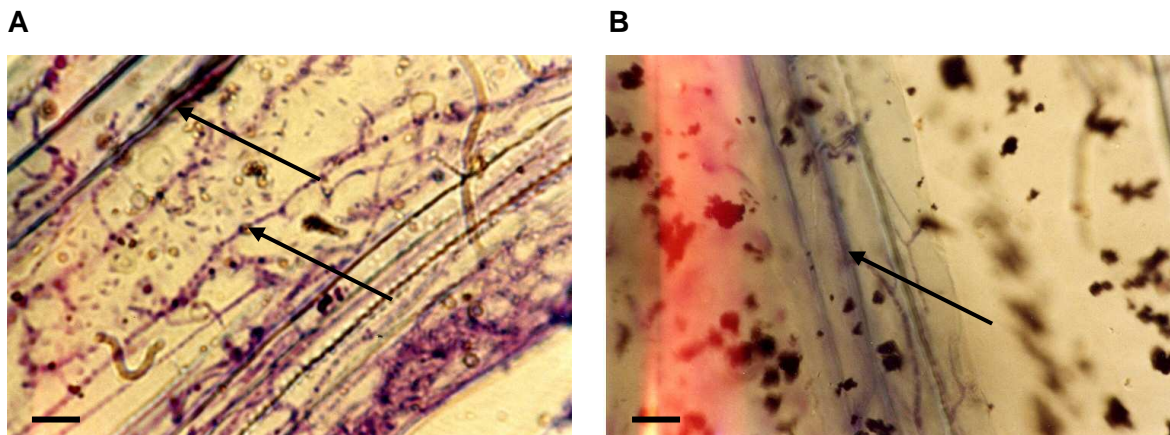


Abb. 3.2 Längsschnitte von *A. arenaria* – Blattsegmenten, die in den Infektionsversuchen (s. 2.5.2) von *Ac. strictum* TUB6911 (A) und *G. graminis* TUB6935 (B) überwachsen wurden. Sichtbar ist sowohl inter- als auch intrazelluläres Pilzwachstum in nicht mehr intaktem pflanzlichem Gewebe. Thionin-Färbung; Vergrößerung 1000fach; Maßstab 10 µm.

Das Experiment lieferte somit lediglich eine Antwort auf die Frage, welche Expansionsmöglichkeiten sich den Pilzen während einer massiven Infektion innerhalb des nicht mehr intakten pflanzlichen Gewebes eröffnen.

3.2 Bestimmungen der Biotrockenmasse

3.2.1 Der Einfluss von Salzstress auf die Biotrockenmasse von *A. arenaria*

Die Einwirkung von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf die Biotrockenmasse (BTM) von *A. arenaria* sollte untersucht werden. Hierfür wurden die Strandhaferkeimlinge entsprechend behandelt (vgl. 2.3.1 A, B und C) und, wie unter 2.1.3 beschrieben, kultiviert. Nach einer vierwöchigen Inkubation erfolgte die Ernte und die Lyophilisierung des Pflanzenmaterials (s. 2.4). Anschließend wurden die gefriergetrockneten Pflanzen zur Bestimmung der Biotrockenmasse herangezogen (s. 2.4). Alle Biotrockenmassewerte, die zu den graphischen Darstellungen herangezogen wurden, sind im Anhang B. 1 einzusehen.



Abb. 3.3 Darstellung von zwei *A. arenaria*-Pflanzen, die über vier Wochen unterschiedlich kultiviert wurden: **A** – Düngung mit M&S-Medium mit 375 mM NaCl und **B** – Düngung mit M&S-Medium (ohne Salzzugabe; Kontrollpflanzen).

Die Resultate der Biotrockenmassebestimmung weisen deutlich darauf hin, dass eine Zunahme der NaCl-Konzentration erwartungsgemäß eine Reduktion der Biotrockenmasse zur Folge hatte. Als Beispiel ist in der Abbildung 3.3 der Unterschied zwischen zwei *A. arenaria*-Pflanzen dargestellt, von denen eine (A) mit 375 mM NaCl und die andere (B) ohne Salzstress über vier Wochen kultiviert wurden (Kontrolle).

Die mit M&S-Medium gedüngten und ohne Pilzinokulation und NaCl kultivierten Kontrollpflanzen (vgl. 2.3.1; Versuchsreihe A) erreichten eine BTM von 1,12 g. Die Steigerung der Salzkonzentration auf 125, 250 und 375 mM NaCl hatte eine fast lineare Abnahme der Biotrockenmasse auf jeweils 0,76, 0,57 und anschließend auf 0,32 g zur Folge. Im letzteren Fall entsprach das einem Verlust der Biotrockenmasse von 71 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.4; Versuchsreihe A). Die Düngung von Strandhafer mit dem M&S-Medium, dem 500 mM NaCl zugesetzt wurde, erwies als letal für die Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Die Kontrollversuche wurden sowohl für die salzgestressten als auch für die von den Pilzen besiedelten *A. arenaria*-Pflanzen durchgeführt (vgl. 2.3.1). Da nach der Bestimmung der beiden Biotrockenmassen kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten bestand, wurde bei der weiteren Auswertung nur der Kontrollwert aus den Salzstressversuchen berücksichtigt (Abb. 3.4).

3.2.2 Biotrockenmasse von *A. arenaria* nach Besiedlung mit den Endophyten und Pathogenen

Einen positiven Einfluss auf die Biotrockenmasse hatte die Besiedlung von *A. arenaria*-Pflanzen mit dem endophytischen Pilz *M. bolleyi* TUB6930. Dabei wurde ein signifikant erhöhter Wert von 1,23 g im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (1,12 g; Abb. 3.4, Versuchsreihe B) ermittelt. Wurde Strandhafer salzgestresst und gleichzeitig mit den endophytischen Pilzisolaten inokuliert (*Ac. strictum* TUB6911 und *M. bolleyi* TUB6930), konnte gegenüber der Kontrolle, kein positiver Einfluss auf die Biotrockenmasse festgestellt werden (vgl. 2.3.1; Versuchsreihe C). Es fiel dennoch auf, dass die mit 125 mM NaCl gestressten und zusätzlich von den endophytischen Pilzen besiedelten Pflanzen mehr Biomasse bildeten (jeweils 0,98 und 0,96 g; Abb. 3.4 Versuchsreihe C), im Vergleich zu dem allein mit 125 NaCl gestressten Strandhafer (0,76 g) (Abb. 3.4, Versuchsreihe A). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Auch nach der Einwirkung von 250 mM NaCl auf die von *Ac. strictum* und *M. bolleyi* besiedelten Pflanzen bildete *A. arenaria* nach vier Wochen Kultivierung nicht weniger Biomasse (jeweils 0,50 und 0,54 g, Abb. 3.4 Versuchsreihe C), als es bei den alleine mit 250 mM NaCl gestressten Pflanzen der Fall war (0,57 g) (Abb. 3.2, Versuchsreihe A). Bildeten die mit 375 mM NaCl gestressten Pflanzen 0,31 g Biotrockenmasse (Abb. 3.4, Versuchsreihe A), wurde bei einem gleichzeitig einwirkenden Salzstress (375 mM) und einer Inokulierung mit den Endophyten eine starke Reduktion der Biomasse festgestellt (0,14 und 0,22 g) (Abb. 3.4, Versuchsreihe C). Gegenüber der Kontrolle bedeutete das eine Abnahme des Gewichtes um jeweils 89 und 82 %.

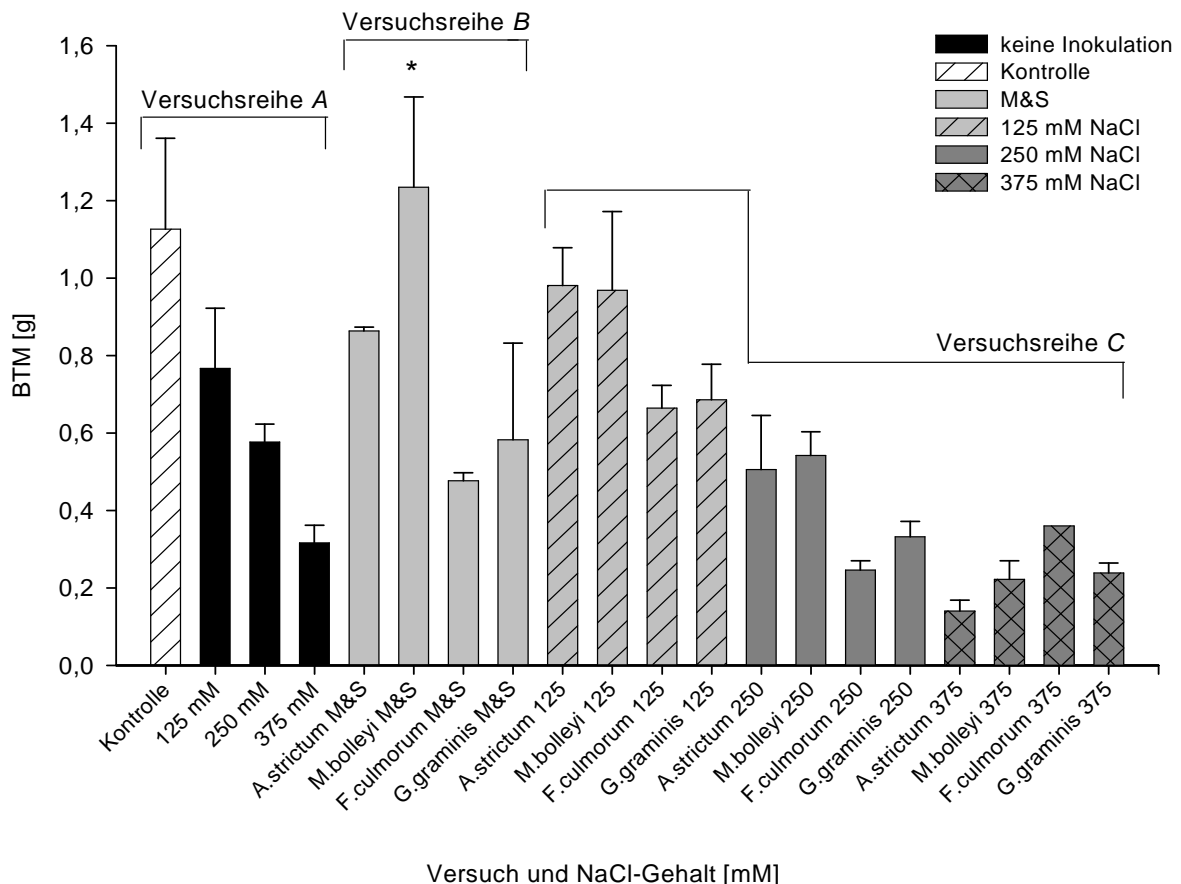


Abb. 3.4 Biotrockenmassen nach der Kultivierung von *A. arenaria*- Pflanzen im M&S-Medium ohne Salz (Kontrolle; weißer Balken, gestreift) bzw. mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (schwarze Balken; Versuchsreihe A = Salzstress) sowie nach der Inokulation der Pflanzen mit ausgewählten Pilzisolaten (*Ac. strictum* TUB6911, *M. bolleyi* TUB6930, *F. culmorum* TUB6927 und *G. graminis* TUB6935) ohne Salzzufuhr (hellgraue Balken; Versuchsreihe B = Besiedlung mit Pilzisolaten) bzw. mit zunehmendem NaCl-Gehalt (125 mM – hellgrau gestreift; 250 mM – dunkelgrau sowie 375 mM – dunkelgrau kariert; Versuchsreihe C = gleichzeitig einwirkender Salzstress sowie Inokulation mit den Pilzisolaten).

BTM – Biotrockenmasse; M&S – Murashige & Skoog-Medium; die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die NaCl-Konzentration im Medium [mM]. Beschreibung der Versuchsreihen s. 2.3.1.

(n = 3; \pm Standardabweichung; $p \leq 0,001$); * - signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Rohdaten s. Anhang B. 1

Die Besiedlung von *A. arenaria* mit den pathogenen Isolaten *F. culmorum* und *G. graminis* hatte bei den über vier Wochen ohne Salzstress kultivierten Pflanzen, im Vergleich zur Kontrolle (1,23 g; Abb. 3.4 Versuchsreihe A), eine Halbierung der Biotrockenmasse zur Folge (jeweils 0,47 und 0,58 g; Abb. 3.4 Versuchsreihe B). Vergleicht man die Biomassen von dem mit 125 mM NaCl gestressten und mit den Pathogenen inokulierten Strandhafer (0,66 und 0,68 g) mit den Pflanzen, die alleine einem 125 mM Salzstress unterzogen wurden (0,76), wurden kaum Unterschiede in der BTM ermittelt. Die Reduktion der Biomasse bei dem infizierten Strandhafer war in diesem Fall eindeutig auf die Salzstresseinwirkung zurückzuführen. Die Steigerung des NaCl-Gehaltes im Medium auf

250 mM resultierte in einer Abnahme der BTM auf 0,24 g (Abb. 3.4, Versuchsreihe C), im Vergleich zu den nur mit 250 mM NaCl kultivierten Pflanzen (0,54 g; Abb. 3.4 Versuchsreihe B). Dies entsprach einer Reduktion der Biomasse um 80 % gegenüber der Kontrolle. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 375 mM verursachte bei den doppelt gestressten Pflanzen keine weitere Reduktion der BTM. Die Werte betrugen bei den mit *F. culmorum* und *G. graminis* infizierten Pflanzen jeweils 0,36 und 0,23 g (Abb. 3.4, Versuchsreihe C).

Bei der Auswertung der Biotrockenmassen von Pflanzen, die mit den pathogenen Isolaten *F. culmorum* und *G. graminis* inokuliert wurden, zeigte sich bei den Versuchen ohne Salzbehandlung bzw. bei den NaCl-Konzentrationen von 125 und 250 mM ein nahezu zweifach niedrigerer BTM-Wert im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen mit endophytischen Pilzen. Als Beispiel bildete *A. arenaria* bei den Experimenten mit dem Pathogen *F. culmorum* und einem gleichzeitig einwirkenden Salzstress (125 oder 250 mM NaCl) jeweils 0,66 bzw. 0,25 g BTM. Bei gleichem Versuch mit dem Endophyten *Ac. strictum* wurde dagegen ein Wert von 0,98 bzw. 0,5 g erreicht. Dieses Ergebnis konnte für das Wachstum der inokulierten Pflanzen bei 375 mM NaCl nicht bestätigt werden (Abb. 3.4, Versuchsreihe C).

3.3 Bestimmung der Salztoleranz sowie der Auswirkung von Salzstress bei den untersuchten Pilzisolaten

3.3.1 Biotrockenmasse von *Ac. strictum* und *F. culmorum* unter Salzstressbedingungen

Die Biotrockenmasse wurde bei den Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 in Abhängigkeit von der Salinität des Wachstumsmediums untersucht (s. 2.6.2). Die Biotrockenmasse von *Ac. strictum* nahm in Medium ohne NaCl-Zugabe erst nach 12 Inkubationstagen zu. Mit 0,05 g erreichte der Pilz dabei eine signifikant erhöhte Biotrockenmasse im Vergleich zu allen mituntersuchten *Ac. strictum*- Ansätzen. Die Zugabe von Salz ins Medium hemmte das Wachstum von diesem Pilz; nach 15 Kultivierungstagen erreichte seine Biotrockenmasse lediglich 0,02 g (Abb. 3.5 A). Die Entwicklung der Proteingehalte resultierte nach neun Tagen in einer Zunahme der Proteinkonzentration auf 64 µg/ml bei dem ohne Salz kultivierten *Ac. strictum*- Isolat und halbierte sich bis zum Ende des Experimentes auf 31 µg/ml (Abb. 3.5 B).

Das Wachstum von *F. culmorum* mit 0,75 M NaCl zeigte einen unterschiedlichen Verlauf im Vergleich zu *Ac. strictum*. Die Entwicklung von diesem Pilz in dem mit NaCl supplementierten Medium wies einen linearen Anstieg der Biomasse sowie nach 12 Inkubationstagen zweifach höhere BTM-Werte (0,23 g), als bei einer Inkubation ohne NaCl auf (0,10 g). Am letzten Messtag reduzierte sich die ermittelten BTM von salzgestressten Pilzen um die Hälfte auf 0,12 g. Die festgestellten Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Ohne NaCl-Zugabe erreichte der Pilz dagegen eine Biotrockenmasse von 0,15 g (Abb. 3.5 A).

Die Proteinkonzentration in den ohne NaCl kultivierten Ansätzen nahm über die ganze Versuchsdauer von 90 auf 425 µg/ml stetig zu. Eine Kultivierung mit Salz resultierte zwar in insgesamt höheren Proteingehalten (185, 287, 243 und 314 µg/ml nach jeweils 3, 6, 9 und 12 Inkubationstagen), wies jedoch zum letzten Messpunkt eine Abnahme der Konzentration auf 267 µg/ml auf (Abb. 3.5 B).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen Resultate von Experimenten zur Salztoleranz und Bestimmung von Wachstumsraten bei den untersuchten Pilzisolaten, die mit verschiedenen Salzkonzentrationen auf festem KM-Medium kultiviert wurden (s. 2.6.1 und 3.3). Auch da waren die Wachstumsraten von *F. culmorum* höher im Vergleich zu den mituntersuchten Pilzen, was auf eine bessere Anpassung von diesem Stamm an den osmotischen Stress hinweist.

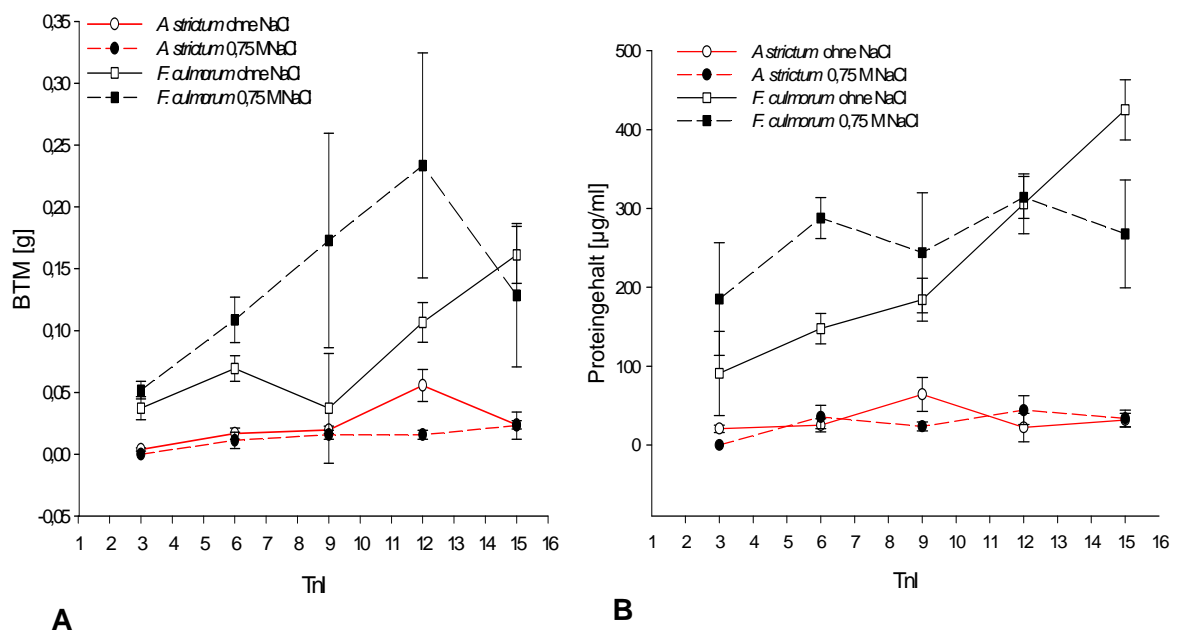


Abb. 3.5 Wachstum von *Ac. strictum* und *F. culmorum* in Czapek-Dox-Medium ohne Salz (rote Kurven) bzw. mit 0,75 M NaCl (schwarze Kurven) (vgl. 2.6.2). Darstellung von **A** – Biotrockenmassen (BTM, [g]) und **B** – Proteingehalten [µg/ml]; **Tnl** – Tage nach Inokulation. (n = 3; \pm - Standardabweichung; p \leq 0,001)

Alle Biotrockenmassen- und Proteinwerte der untersuchten Pilzisolat, die zu den graphischen Darstellungen herangezogen wurden, sind im Anhang B. 2 und E. 2 einzusehen.

3.3.2 Bestimmung der Salztoleranz und Wachstumsraten bei den Pilzisolaten

Der Einfluss verschiedener NaCl-Konzentrationen auf das Pilzwachstum sowie die Salztoleranz der ausgewählten Pilzisolat wurden untersucht (vgl. 2.6.1). Die Stämme *Ac. strictum* TUB6911, *F. culmorum* TUB6927, *M. bolleyi* TUB6930 und *G. graminis* TUB 6935 wuchsen, wie unter 2.6.1 beschrieben, auf KM-Agar ohne Salz bzw. mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0,75; 1,25 und 2 M NaCl), was am Beispiel von *M. bolleyi* TUB6930 in der Abbildung 3.6 zu sehen ist.

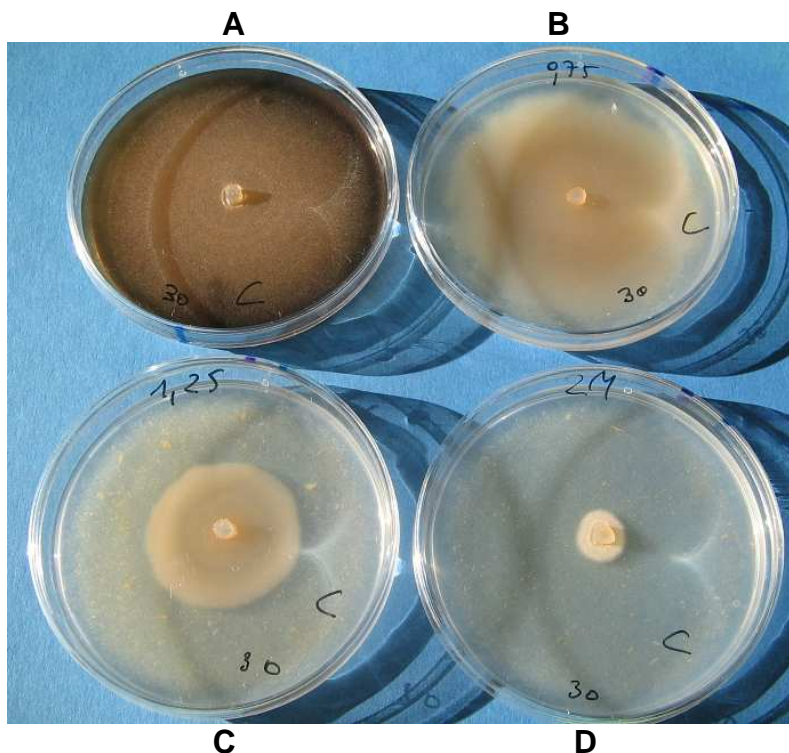


Abb. 3.6 Beispiel für das Wachstum von Pilzisolaten (hier *M. bolleyi* TUB6930) auf KM-Agar ohne Salz bzw. mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen: (A – ohne Salz, B – 0,75 M; C – 1,25 M und D – 2 M NaCl)

Die Erhöhung der Mediumsalinität wirkte sich unterschiedlich auf das Wachstum der eingesetzten Pilze aus (Abb. 3.7). Die höchste Toleranz gegenüber ansteigenden NaCl-Konzentrationen wies das Isolat *F. culmorum* auf, das noch bei einer NaCl-Konzentration von 2 M wuchs (1,6 mm/Tag). Die Wachstumsraten ohne bzw. mit 0,75 M Salz lagen bei 11,2 und mit 1,25 M NaCl bei 9 mm/Tag.

Die Isolate *M. bolleyi* und *Ac. strictum* waren in der Lage die Salzkonzentrationen bis zu 2 M zu tolerieren. Bei dem höchsten Salzgehalt wiesen sie jedoch geringe Wachstumsraten von 0,25 und 0,07 mm/Tag auf. *G. graminis* wuchs nur ohne bzw. mit 0,75 M NaCl (Wachstumsraten von 6,9 und 1,9 mm/Tag). Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration hemmte vollständig seine Entwicklung.

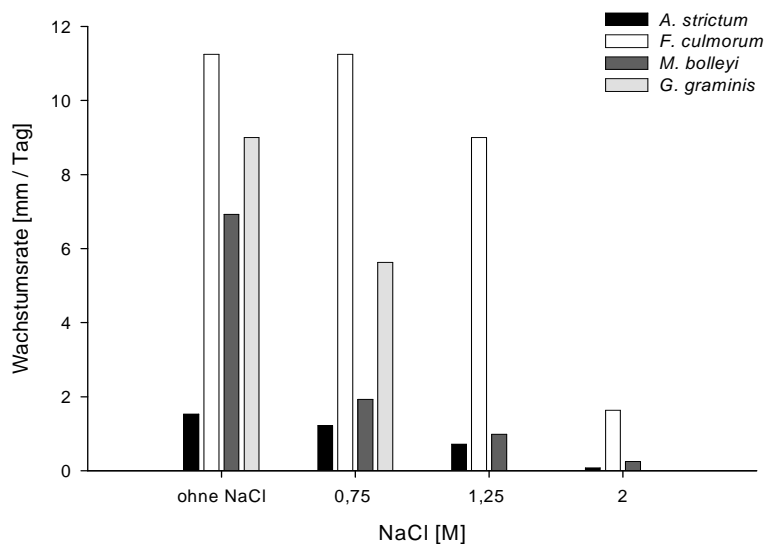


Abb. 3.7 Wachstumsraten [mm/Tag] von den Isolaten *Ac. strictum* TUB6911, *F. culmorum* TUB6927, *M. bolleyi* TUB6930 und *G. graminis* TUB6935 in Abhängigkeit von der Mediumsalinität.

Die Kultivierung der Pilze erfolgte über 16 Tage auf KM-Agar mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (ohne Salz, 0,75 M, 1,25 M und 2 M) und bei RT. Das Wachstum wurde alle 2 Tage überprüft und anschließend wurden die Wachstumsraten ermittelt.

Alle Wachstum- und Wachstumsratenwerte, die zu der graphischen Darstellung herangezogen wurden, sind im Anhang C. 1 und C. 2 einzusehen.

3.4 Einfluss von Salztress und / oder Pilzbesiedlung auf den Aminosäurenmetabolismus von *A. arenaria*

Einer der Stressfaktoren, der die Entwicklung und das Wachstum von Pflanzen in der Umwelt erheblich beeinträchtigt, ist die Salinität (MÜHLING & LÄUCHLI, 2002; VIJAYAN *et al.* 2003; MEHTA *et al.* 2005; MUNNS, 2005). Um sich gegen Salzstress zu schützen, besitzen Pflanzen mehrere Stoffwechselprozesse, zu denen u.a. die Bildung von kompatiblen Soluten gehört (s. 1.1.2 und 4.2).

Als Folge einer Besiedlung mit Pilzen kann der Aminosäurespiegel der Pflanze ebenso Veränderungen erfahren (SOLOMON & OLIVER, 2001; WAGNER, 2002). Dies kann durch die Fähigkeit der Pilze zur Verwertung von unterschiedlichen N-Quellen (Ammonium, L-Glutamat, L-Glutamin, Asparagin oder Prolin) zustande kommen (MARZLUF, 1997).

Nachfolgend wird die durch den Salzstress und / oder Pilzbesiedlung bedingte Produktion von osmoprotektiven Substanzen sowie Veränderungen in dem Aminosäurenpool des Strandhafers dargestellt. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen gleichzeitig Versuche, die die Aktivitäten von Enzymen ermitteln, die indirekt in den Aminosäurenmetabolismus eingreifen (hier Fd-GOGAT).

Für die Durchführung der Experimente wurden die Pflanzen, wie unter 2.3.1 *A*, *B* und *C* beschrieben, behandelt, über vier Wochen kultiviert (s. 2.1.3), nach der Ernte lyophilisiert (s. 2.4) und das Pflanzenmaterial anschließend zur Extraktion von freien Aminosäuren herangezogen (s. 2.7.1.2). Die Vermessung erfolgte mittels HPLC (vgl. 2.7.1.4).

In den pflanzlichen Extrakten wurden insgesamt 17 verschiedene L-Aminosäuren nachgewiesen. Bei vielen von ihnen (z.B. L-Isoleucin oder L-Leucin) konnten keinerlei Veränderungen festgestellt werden, die auf eine Einwirkung durch Salzstress und / oder Inokulation mit den Pilzisolaten zurückzuführen wären. Aus diesem Grund konzentrieren sich die dargestellten Resultate auf die acht Aminosäuren, die eine eindeutige Beeinflussung in den durchgeführten Versuchen erfuhren: L-Asparagin (L-Asn), L-Glutamin (L-Gln), L-Asparaginsäure (L-Asp), L-Serin (L-Ser), L-Glutaminsäure (L-Glu), L-Alanin (L-Ala), L-Prolin (L-Pro) und L-Valin (L-Val) (Abb. 3.8).

Zur allgemeinen Darstellung der Veränderungen in den Gehalten von den acht L-Aminosäuren wurden lineare Verbindungen zwischen einzelnen Versuchen gewählt, um den Einfluss von Salzstress und / oder Besiedlung mit den Pilzisolaten auf die Aminosäurenkonzentrationen besser verdeutlichen zu können (Abb. 3.8).

Alle Daten der Aminosäurenkonzentrationen die zu den graphischen Darstellungen herangezogen wurden, sind im Anhang F. 1 einzusehen.

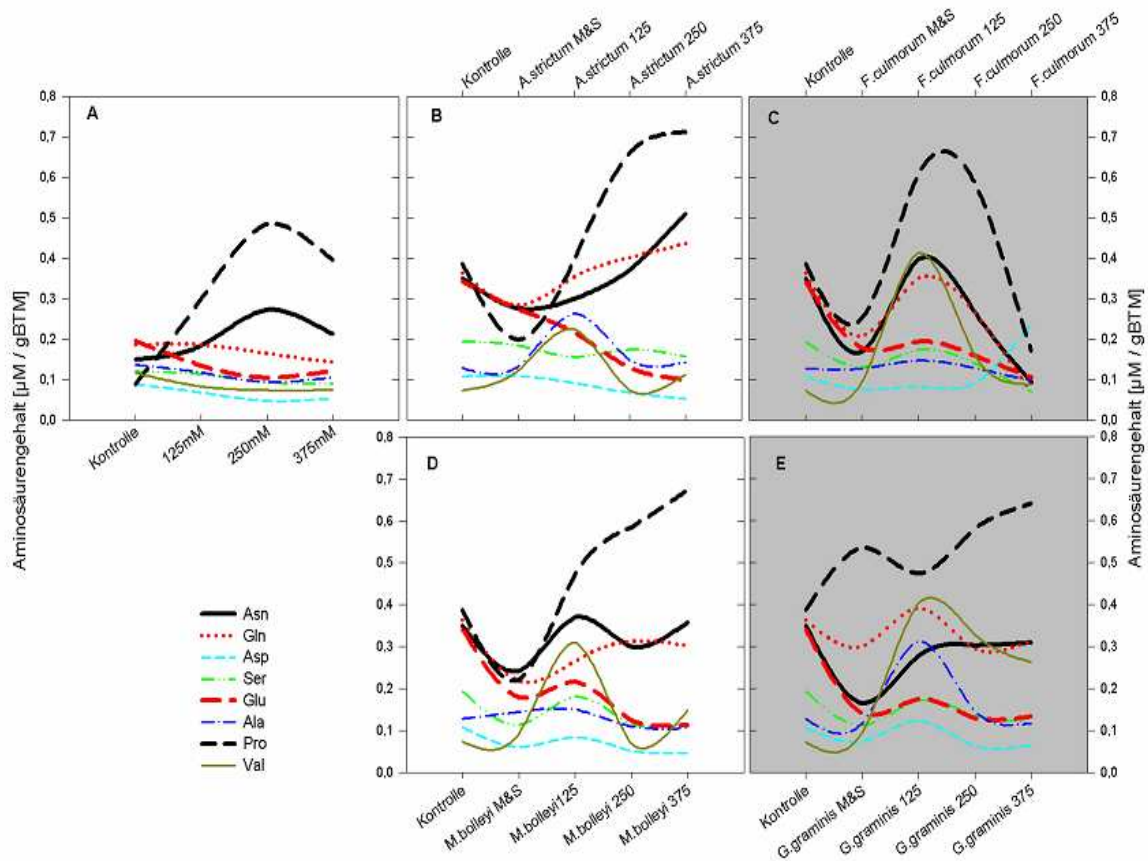


Abb. 3.8 Veränderungen in den Gehalten von acht verschiedenen L-Aminosäuren von *A. arenaria* in Abhängigkeit von Salzstress und / oder Inokulation mit den Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). **A** – Kultivierung von *A. arenaria* ohne (Kontrolle) bzw. in drei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM; Versuchsreihe A - keine Pilzbesiedlung). **B** - Nach der Inokulation von Strandhafer mit *Ac. strictum* und unter verschiedenen Salzstressbedingungen (125, 250 und 375 mM NaCl). Das Gleiche gilt für Versuche mit *F. culmorum* (**C**); *M. bolleyi* (**D**) und *G. graminis* (**E**). Die Kontrollpflanzen wuchsen ohne Pilzinokulation und wurden mit M&S-Medium gedüngt. Bei den Versuchen mit pathogenen Pilzisolaten wurden die Diagrammfelder grau markiert (C und D). M&S – Murashige & Skoog-Medium. Die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die Salinität des Mediums in mM.

Im Weiteren werden die Veränderungen im Aminosäurenpool einzeln behandelt und genauer erklärt.

3.4.1 L-Prolin, L-Glutamin und L-Glutaminsäure

Die Ermittlung der Aminosäuregehalte von L-Prolin, L-Glutamin und L-Glutaminsäure bei den ohne Salz bzw. mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl; abiotischer Stress) kultivierten *A. arenaria*- Pflanzen, ergab vorwiegend Veränderungen im L-Prolinspiegel (Abb. 3.9 A). Der L-Prolingehalt stieg signifikant von 0,09 µM/gBTM bei den Kontrollpflanzen (ohne Salzzugabe) auf 0,3 µM/gBTM nach einer Kultivierung mit 125 mM NaCl. Signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrolle mit jeweils 0,48 (fünffach erhöht) und 0,40 µM/gBTM wurden ebenfalls nach einem Salzstress mit 250 und 375 mM NaCl registriert (Abb. 3.9 A).

Die Zugabe von 125, 250 oder 375 mM NaCl zum M&S-Medium resultierte gegenüber den Kontrollpflanzen (0,19 $\mu\text{M/gBTM}$ in signifikant reduzierten L-Glutamatmengen (jeweils 0,13; 0,10 und 0,12 $\mu\text{M/gBTM}$) (Abb. 3.9 A). Die Abnahme des L-Glutamatgehaltes korrelierte dabei mit der Steigerung der L-Prolinwerte. Die salzstressbedingte Abnahme der L-Glutaminkonzentration war nicht signifikant verschieden (Abb. 3.9 A).

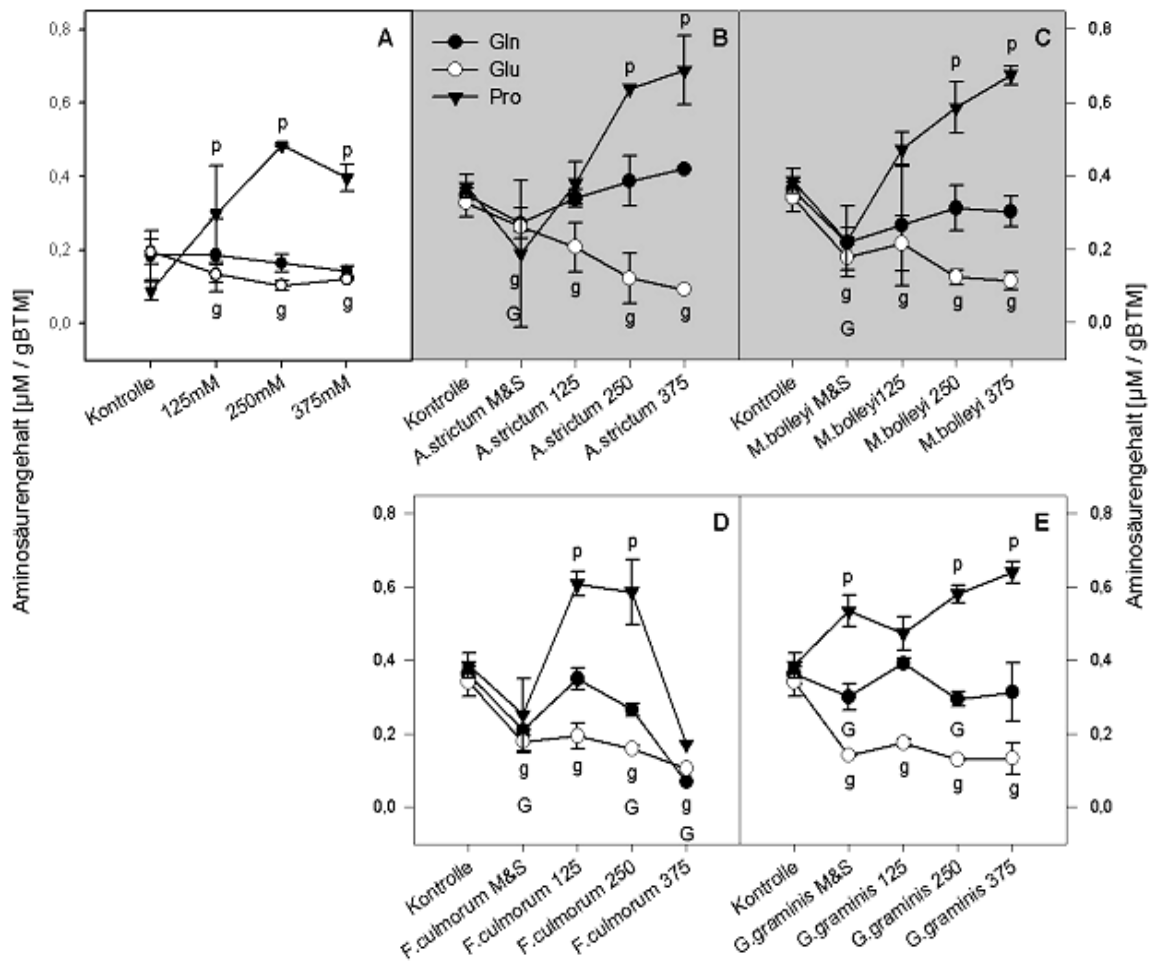


Abb. 3.9 L-Prolin- L-Glutaminsäure- und L-Glutamingehalte in Extrakten von *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums (**A**) und / oder einer Inokulation mit endophytischen (*Ac. strictum* und *M. bolleyi*; **B** und **C**, grau markierte Felder) bzw. mit pathogenen (*F. culmorum* und *G. graminis*; **D** und **E**, weiße Felder) Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).

Gln – L-Glutamin; Glu – L-Glutaminsäure; Pro – L-Prolin. Die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die Salinität des Murashige & Skoog- Mediums (M&S) in mM.

(n = 3, \pm - Standardabweichung, $p \leq 0,001$); Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten wurden folgendermaßen bezeichnet: **p** für L-Pro; **g** für L-Glu und **G** für L-Gln.

Die Prolingehalte der Kontrollen bei dem mit den Pilzisolaten inokulierten und ohne Salzstress kultivierten Strandhafer (Abb. 3.9 B – E) lagen nach vier Kultivierungswochen höher (jeweils 0,38 $\mu\text{M/gBTM}$) als bei den von den Pilzisolaten (*Ac. strictum*, *F. culmorum* und *M. bolleyi*) besiedelten Pflanzen (jeweils 0,19; 0,22 und 0,25 $\mu\text{M/gBTM}$) (Abb. 3.9 B

– D). Eine Ausnahme konnte bei dem mit *G. graminis* inokulierten Strandhafer beobachtet werden, bei dem die Pilzbesiedlung eine Konzentrationssteigerung an L-Prolin auf 0,53 $\mu\text{M/gBTM}$, im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, zur Folge hatte (Abb. 3.9 E). Die Steigerung des Salzgehaltes im M&S-Medium erhöhte, im Vergleich zur Kontrolle, die L-Prolinwerte, die bei der höchsten NaCl-Konzentration (375 mM) auch die größten, signifikant erhöhten Gehalte aufwiesen. Die Werte betrugen dabei 0,71; 0,67 und 0,64 $\mu\text{M/gBTM}$ bei den jeweils mit *Ac. strictum*, *M. bolleyi* und *G. graminis* inokulierten *A. arenaria*-Pflanzen (Abb. 3.9 B, C und E). Nur nach der Besiedlung durch *F. culmorum* konnte unter gleichen Bedingungen ein Abfall der L-Prolinkonzentration auf 0,17 $\mu\text{M/gBTM}$ registriert werden (Abb. 3.9 D).

Es wurde ebenfalls ermittelt, dass die Prolingehalte der mit den Pilzen inokulierten und salzgestressten Pflanzen um ca. 30 % erhöht waren (z.B. 0,71 $\mu\text{M/gBTM}$ bei der Besiedlung mit *Ac. strictum* und einem 375 mM NaCl-Stress; Abb. 3.9 B), im Vergleich zu denen, die allein dem Salzstress ausgesetzt waren (z.B. 0,48 $\mu\text{M/gBTM}$ bei den mit 250 mM NaCl gestressten Pflanzen; Abb. 3.9 A).

Die L-Glutamatgehalte verringerten sich bei den mit den Pilzisolaten inokulierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen (0,34 $\mu\text{M/gBTM}$) und nahmen mit steigenden Salzkonzentrationen weiter ab. Nach einer vierwöchigen Kultivierung von *A. arenaria* in 375 mM NaCl waren die L-Glutamatgehalte am geringsten und erreichten 0,09 oder 0,10 $\mu\text{M/gBTM}$ bei den jeweils von *Ac. strictum* und *F. culmorum* besiedelten Pflanzen (Abb. 3.8 B und D).

Die Kurven für L-Prolin und L-Glutamat wiesen bei den mit den Pilzisolaten inokulierten Pflanzen (Abb. 3.9 B – D), ähnlich wie bei den Versuchen ohne Pilzbesiedlung (Abb. 3.9 A), einen entgegengesetzten Verlauf auf. Eine Steigerung der L-Prolinkonzentration korrelierte auch hier mit einer Verringerung der L-Glutamatgehalte.

3.4.2 L-Asparaginsäure, L-Serin und L-Alanin

Bei den salzgestressten und ohne Pilzisolate kultivierten Pflanzen erfolgte für L-Asparaginsäure, L-Serin und L-Alanin eine Abnahme ihrer Konzentration, die mit der Steigerung des NaCl-Gehaltes im M&S-Medium übereinstimmte (Abb. 3.10 A). L-Asparaginsäure nahm bei 375 mM NaCl (0,05 $\mu\text{M/gBTM}$), im Vergleich zur Kontrolle (0,09 $\mu\text{M/gBTM}$), signifikant ab (Abb. 3.10 A).

Wurde *A. arenaria* von *F. culmorum*, *M. bolleyi* oder *G. graminis* besiedelt und ohne Salz kultiviert, waren die L-Asparaginsäuregehalte der inokulierten Pflanzen signifikant

verringert im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.10 C, D und E). Bei dem mit *Ac. strictum* inokulierten Strandhafer wurde dagegen keine Veränderung der L-Asparaginsäure, im Vergleich zur Kontrolle, festgestellt (jeweils 0,1 $\mu\text{M/gBTM}$). Die Steigerung des Salzgehaltes im M&S-Medium verursachte für die kolonisierten Pflanzen, außer bei der Besiedlung mit *F. culmorum*, eine signifikante Reduktion des L-Asparaginsäuregehaltes (Abb. 3.11 B, C und E). Bei den Experimenten mit *F. culmorum* TUB6927 resultierte die Erhöhung des Salzgehaltes auf 375 mM dagegen in einer steilen Zunahme der L-Asparaginsäurekonzentration (0,23 $\mu\text{M/gBTM}$) (Abb. 3.10 D).

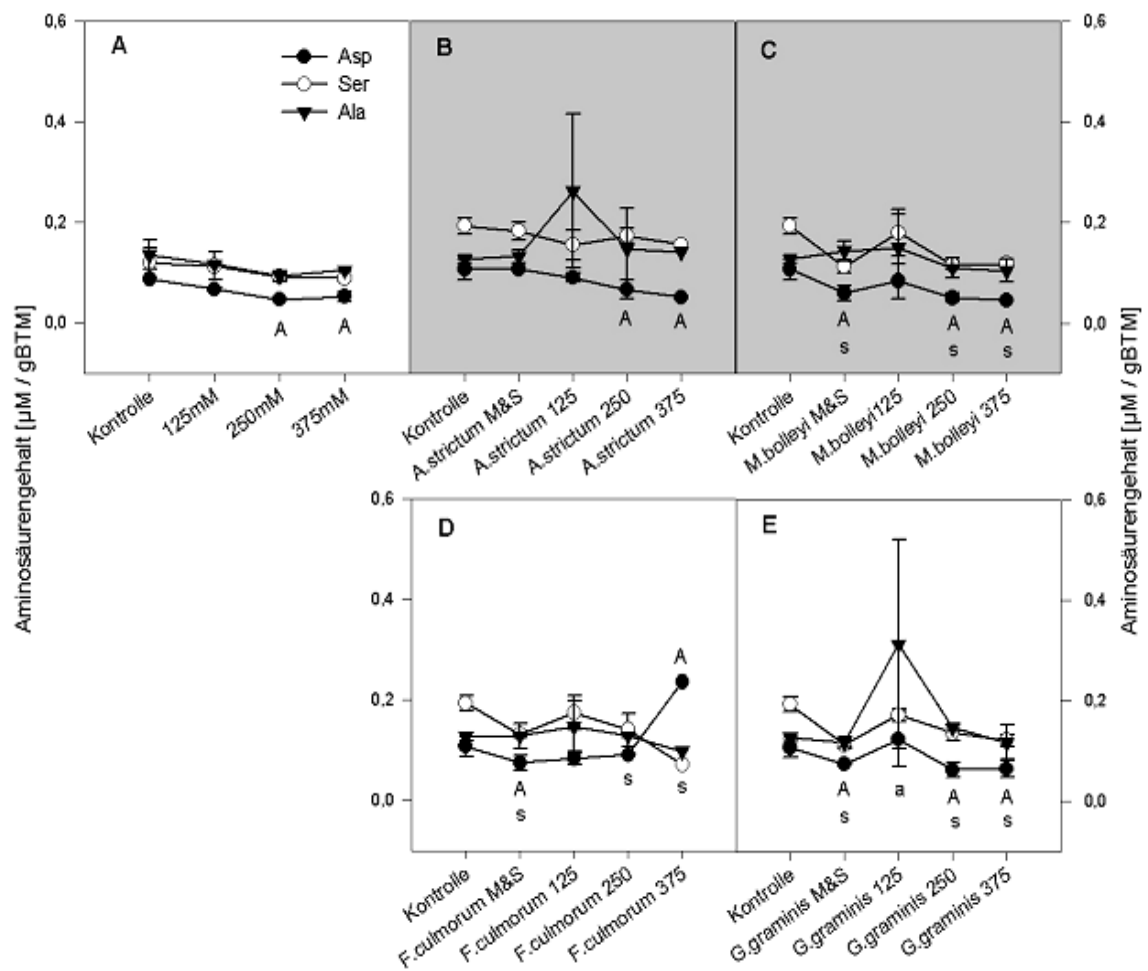


Abb. 3.10 L-Asparaginsäure- L-Serin- und L-Alaniningehalte in Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums (**A**) und / oder einer Inokulation mit endophytischen (*Ac. strictum* und *M. bolleyi*; **B** und **C**; grau markierte Felder) bzw. pathogenen (*F. culmorum* und *G. graminis*; **D** und **E**; weiße Felder) Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).

Asp – L-Asparaginsäure; Ser – L-Serin; Ala – L-Alanin. Die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die Salinität des Murashige & Skoog- Mediums (M&S) in mM.

(n = 3, \pm - Standardabweichung, $p \leq 0,001$); Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten wurden folgendermaßen bezeichnet: **A** für L-Asp; **s** für L-Ser und **a** für L-Ala.

Bei den Versuchen mit *Ac. strictum* TUB6911 waren die L-Serinkonzentrationen in den Pflanzenextrakten nur gering verändert (Abb. 3.10 B). Wurde der Strandhafer jedoch mit *M. bolleyi* TUB6930, *F. culmorum* TUB6927 oder *G. graminis* TUB6935 inokuliert, zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle (0,19 $\mu\text{M/gBTM}$) signifikant verringerte L-Seringehalte (jeweils 0,11; 0,13 und 0,11 $\mu\text{M/gBTM}$) (vgl. Abb. 3.10 C – E).

Die Konzentrationen von L-Alanin waren in den untersuchten Ansätzen geringfügig verändert, dass auf keine Beeinflussung durch den Salzstress bzw. die Inokulierung mit den Pilzisolaten schließen lässt. Bei allen durchgeführten Experimenten zeigten die L-Alaninkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollgehalten. Nur bei dem mit *G. graminis* inokulierten und gleichzeitig in 125 mM NaCl kultivierten Strandhafer war der L-Alaniningehalt mit 0,31 $\mu\text{M/gBTM}$ im Vergleich zur Kontrolle (0,19 $\mu\text{M/gBTM}$) signifikant erhöht (Abb. 3.10 D).

3.4.3 L-Asparagin und L-Valin

Die Konzentration an L-Valin bei den salzgestressten und ohne Pilzbesiedlung kultivierten Pflanzen ging mit steigender Mediumsalinität geringfügig zurück, jedoch waren die Differenzen nicht signifikant (Abb. 3.11 A).

Bei den Versuchen mit den inokulierten Pflanzen konnte dagegen eine Erhöhung der L-Valinkonzentration bei allen mit 125 mM NaCl kultivierten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3.11 B, C, D, und E). Für die Versuche mit *M. bolleyi* TUB6930; *F. culmorum* TUB6927 sowie *G. graminis* TUB6935 unterschieden sich die Werte dabei signifikant von den Kontrollen (jeweils 0,30; 0,41 und 0,40 $\mu\text{M/gBTM}$; Abb. 3.11 C, D und E).

Wurden die inokulierten *A. arenaria*- Pflanzen mit 250 mM NaCl gestresst, nahm die L-Valinkonzentration in allen Extrakten ab. Wurden die Pflanzen von den beiden endophytischen Pilzisolaten (*Ac. strictum* und *M. bolleyi*) besiedelt und mit 375 mM NaCl gestresst, zeigte sich eine leichte Steigerung des L-Valingehaltes (jeweils auf 0,11 und 0,14 $\mu\text{M/gBTM}$) (Abb. 3.11 B und C). Die Werte waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Bei den mit den Pathogenen *F. culmorum* und *G. graminis* inokulierten Pflanzen, auf die über vier Wochen lang 375 mM NaCl einwirkte, konnte dagegen ein kontinuierlicher Abfall der L-Valinkonzentration ermittelt werden (jeweils 0,08 und 0,26 $\mu\text{M/gBTM}$). Die Werte waren jedoch nicht signifikant verschieden (Abb. 3.11 D und E).

Die L-Asparaginkonzentrationen stiegen in den über vier Wochen mit 125 mM NaCl gestressten Pflanzen ohne Pilzbesiedlung leicht an. Aber erst eine Kultivierung mit 250 mM NaCl erhöhte den Gehalt signifikant auf 0,27 $\mu\text{M/gBTM}$. Eine Mediumsalinität von 375

mM NaCl verursachte eine Abnahme des L-Asparagingehaltes in den Pflanzenextrakten (Abb. 3.11 A).

Bei den Experimenten mit den Pilzisolaten wurden in allen Kontrollproben stets höhere L-Asparagingehalte ermittelt, als das bei den mit Pilzen inokulierten Pflanzen der Fall war. Die Besiedlung von *A. arenaria* mit den Stämmen *M. bolleyi*, *F. culmorum* und *G. graminis* resultierte in signifikant reduzierten L-Asparagingehalten (jeweils 0,24; 0,17 und 0,17 $\mu\text{M/gBTM}$) gegenüber den Kontrollen (0,35 $\mu\text{M/gBTM}$), (Abb. 3.11 C, D und E). Die Steigerung der Salzkonzentration auf 125 mM NaCl führte in allen untersuchten Ansätzen zu leichten Zunahmen der L-Asparagingehalte. Eine weitere Steigerung der NaCl-Konzentration im M&S-Medium auf 250 und 375 mM wirkte sich, im Vergleich zur Kontrolle, lediglich bei den mit *Ac. strictum* infizierten Pflanzen durch eine signifikante Erhöhung des L-Asparagingehaltes aus (0,50 $\mu\text{M/gBTM}$; Abb. 3.11 B). In gleichen Experimenten mit *F. culmorum* TUB6927 zeigte sich dagegen eine starke Abnahme der L-Asparaginkonzentration, die mit der zunehmenden Mediumsalinität korrelierte. Bei einer Mediumsalinität von 375 mM konnte dabei ein Wert von 0,09 $\mu\text{M/gBTM}$ registriert werden (signifikant unterschiedlich; Abb. 3.11 D). Für die Versuche mit *M. bolleyi* und *G. graminis* konnten im Vergleich zu Kontrollpflanzen keinen signifikanten Differenzen festgestellt werden, die auf eine Beeinflussung durch die Zunahme der Mediumsalinität hindeuten würden (Abb. 3.11 C und E).

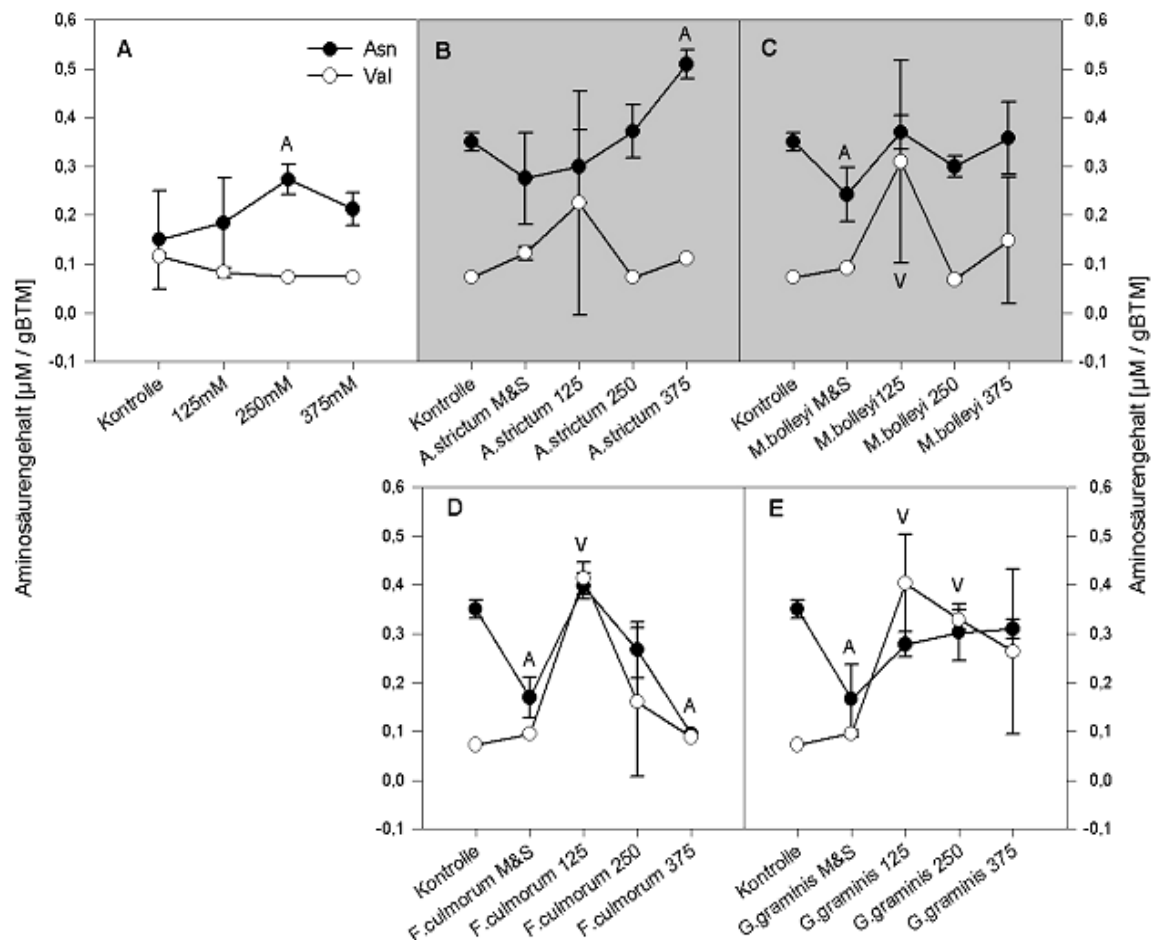


Abb. 3.11 L-Asparagin- und L-Valingehalte in Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums (**A**) und / oder einer Inokulation mit endophytischen (*Ac. strictum* und *M. bolleyi*; **B** und **C**; grau markierte Felder) bzw. mit pathogenen (*F. culmorum* und *G. graminis*; **D** und **E**; weiße Felder) Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Asn – L-Asparagin; Val – L-Valin. Die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die Salinität des M&S-Mediums in mM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten wurden folgendermaßen bezeichnet: **A** für L-Asn; **V** für L-Val. ($n = 3$, \pm - Standardabweichung, $p \leq 0,001$); **M&S** – Murashige & Skoog- Medium

3.5 Einfluss von Salzstress auf den Aminosäuren-metabolismus der untersuchten Pilzisolat

Zur Untersuchung des Aminosäurenpools bei den Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration, wurden die Pilze in flüssigem Czapek-Dox-Medium ohne bzw. mit 0,75 mM NaCl kultiviert (s. 2.6.2). Die Extraktion von freien Aminosäuren erfolgte wie unter 2.7.1.2 dargestellt. Die Analytik wurde mittels HPLC durchgeführt (vgl. 2.7.1.4).

Bei der Auswertung der Aminosäuregehalte von den beiden untersuchten Pilzisolaten konnten bei 8 von 16 detektierbaren Aminosäuren Konzentrationsänderungen festgestellt werden. Hierzu zählten: L-Glutamin (Gln), L-Serin (Ser), L-Glutaminsäure (Glu), L-

Threonin (Thr), L-Glycin (Gly), L-Alanin (Ala), L-Prolin (Pro) und L-Lysin (Lys). Die vorgefundenen Unterschiede waren jedoch nicht signifikant verschieden.

Bei der Untersuchung der Extrakte aus *Ac. strictum* TUB6911 konnte kein Einfluss von NaCl im Wachstumsmedium auf den Aminosäurenpool des Mikroorganismus beobachtet werden. Für L-Gly und L-Ala konnten sowohl in Abhängigkeit von der Mediumsalinität als auch der Kultivierungszeit, einzelne Konzentrationsschwankungen festgestellt werden. Die auftretenden Unterschiede zeigten sich jedoch als nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 3.12; Daten s. Anhang F. 2).

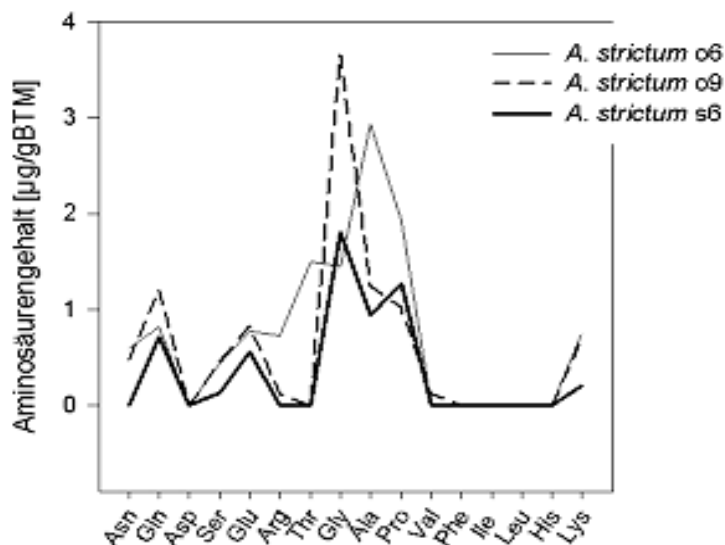


Abb. 3.12 Aminosäuregehalte von *Ac. strictum* TUB6911 in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Czapek-Dox-Mediums, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Zur besseren Darstellung der möglichen Konzentrationsänderungen wurden die einzelnen Aminosäuren miteinander verbunden.

o – Wachstum im Czapek-Dox-Medium ohne Salz; s – Wachstum im Czapek-Dox-Medium mit 0,75 mM NaCl. Die Zahlen, die in der Legende bei den Pilznamen stehen, deuten auf die Kultivierungszeit in Tagen hin. (n = 3).

Die Auswertung des Aminosäurenpools von *F. culmorum* zeigte für die mit Salz gestressten Ansätze eine von der Kultivierungszeit abhängige Abnahme der Aminosäuregehalte, die jedoch statistisch keine signifikanten Unterschiede aufwies (Abb. 3.13 A). Eine leichte Zunahme von Prolin wurde nach drei Tagen bei dem in 0,75 M NaCl kultivierten *F. culmorum* festgestellt (Abb. 3.13 B). Die L-Prolinkonzentration unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem ohne Salz kultivierten Ansatz. Nach sechs und neun Wachstumstagen konnte diese Aminosäure kaum noch in den Pilzextrakten detektiert werden. Das Wachstum von *F. culmorum* in NaCl-haltigem Medium wies auf keine salzbedingte Einwirkung auf den gesamten Aminosäurenpool hin (Abb. 3.13 B).

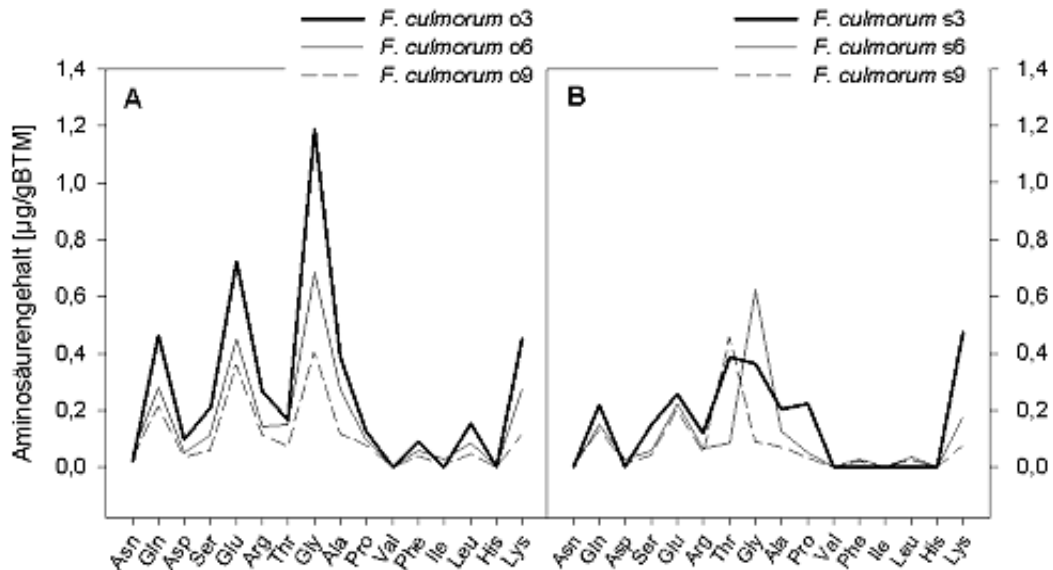


Abb. 3.13 Aminosäuregehalte von *F. culmorum* TUB6927 in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Czapek-Dox-Mediums, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Zur besseren Darstellung der möglichen Konzentrationsänderungen wurden die einzelnen Aminosäuren miteinander verbunden.

o – Wachstum im Czapek-Dox-Medium ohne Salz; s – Wachstum im Czapek-Dox-Medium mit 0,75 mM NaCl; BTM - Biotrockenmasse. Die Zahlen, die in der Legende bei den Pilznamen stehen, deuten auf Kultivierungszeit in Tagen hin. (n = 3)

3.6 Einfluss von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf den Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus von *A. arenaria*

Die im Calvin-Zyklus gebildeten Kohlenhydrate dienen vor allem der Versorgung der Pflanze mit Energie (Stärke, Fructane, ATP). Zucker und Zuckeralkohole (z.B. Saccharose, Mannitol) werden in den Pflanzen aber auch als Antwort auf die Besiedlung durch Mikroorganismen oder auf den abiotischen Stress (z.B. Salzstress) synthetisiert (HELDT, 1996). Sie fungieren gleichzeitig als Depot von Reduktionskraft (LEWIS & SMITH, 1967). Als im Cytoplasma gespeicherte kompatible Solute gleichen sie den osmotischen Druck aus, der durch die Kompartimentierung von toxischen Na^+ - bzw. Cl^- - Ionen in der Vakuole entsteht (VERMA, 1999; YOKOI *et al.* 2002). Eine besondere Funktion von Kohlenhydraten in den Interaktionen zwischen Pflanze und Pilz ist die Bildung von Reservopolysacchariden der Pflanzen und von Zuckeralkoholen, die eine wichtige Funktion im Pilzmyzel einnehmen (WAGNER, 2002).

Um die Einwirkung von Salzstress und / oder Inokulierung von Strandhafer mit den Pilzisolaten auf den Zucker- und Zuckeralkoholpool von *A. arenaria* zu untersuchen,

wurden die Pflanzen wie unter 2.3.1 und 2.1.3, beschrieben, kultiviert und behandelt. Nach der Extraktion der Kohlenhydrate aus dem Pflanzenmaterial (vgl. 2.7.2.2) erfolgte die Analyse mittels HPLC (s. 2.7.2.3). Alle Daten der Zucker- und Zuckeralkoholkonzentrationen, die zu den graphischen Darstellungen herangezogen wurden, sind im Anhang G einzusehen.

Die Untersuchungen der Kohlenhydratgehalte bei Strandhafer, in Abhängigkeit von der Mediumsalinität und / oder der Inokulation mit den Pilzisolaten, ergaben Änderungen in den Konzentrationen von drei detektierbaren Zuckern (D-Saccharose, D-Glucose und D-Fructose; Abb. 3.14, A - E) sowie von einem Zuckeralkohol (D-Mannitol) (Abb. 3.15).

Wurden die Pflanzen dem abiotischen Stress ohne Pilzbesiedlung ausgesetzt, zeigte sich lediglich bei dem in 125 mM NaCl kultivierten Strandhafer ein für D-Fructose signifikant erhöhter Wert von 45,6 mg/gBTM im Vergleich zur Kontrolle (14,7 mg/gBTM) (Abb. 3.14 A). Die aus der gleichen Abbildung ersichtlichen salzstressbedingten Veränderungen in Gehalten von D-Saccharose und D-Glucose waren nicht signifikant unterschiedlich.

Die Auswertungen der Versuche, bei denen *A. arenaria* mit den Pilzisolaten inokuliert wurde, wiesen mit wenigen Ausnahmen keinen signifikanten Einfluss von Salzstress und / oder Besiedlung mit den Pilzisolaten auf den Zucker- und Zuckeralkoholpool von Strandhafer auf (Abb. 3.14 B – D).

Eine signifikant verringerte D-Saccharosekonzentration (4,18 mg/gBTM) gegenüber der Kontrolle (5,9 mg/gBTM) wurde bei den mit *M. bolleyi* TUB6930 besiedelten Pflanzen und einem gleichzeitig einwirkenden Salzstress von 125 mM ermittelt (Abb. 3.14 C).

Die Fructosegehalte waren in nur zwei Fällen gegenüber der Kontrolle (3,7 mg/gBTM) signifikant erhöht. Bei den mit *Ac. strictum* inokulierten Pflanzen stieg die Fructosekonzentration auf 25,3 mg/gBTM an (Abb. 3.14 A). Der Fructosegehalt der von *G. graminis* besiedelten Pflanzen war unter gleichzeitiger Einwirkung von 125 mM NaCl-Stress erhöht (23,3 mg/gBTM; Abb. 3.14 E).

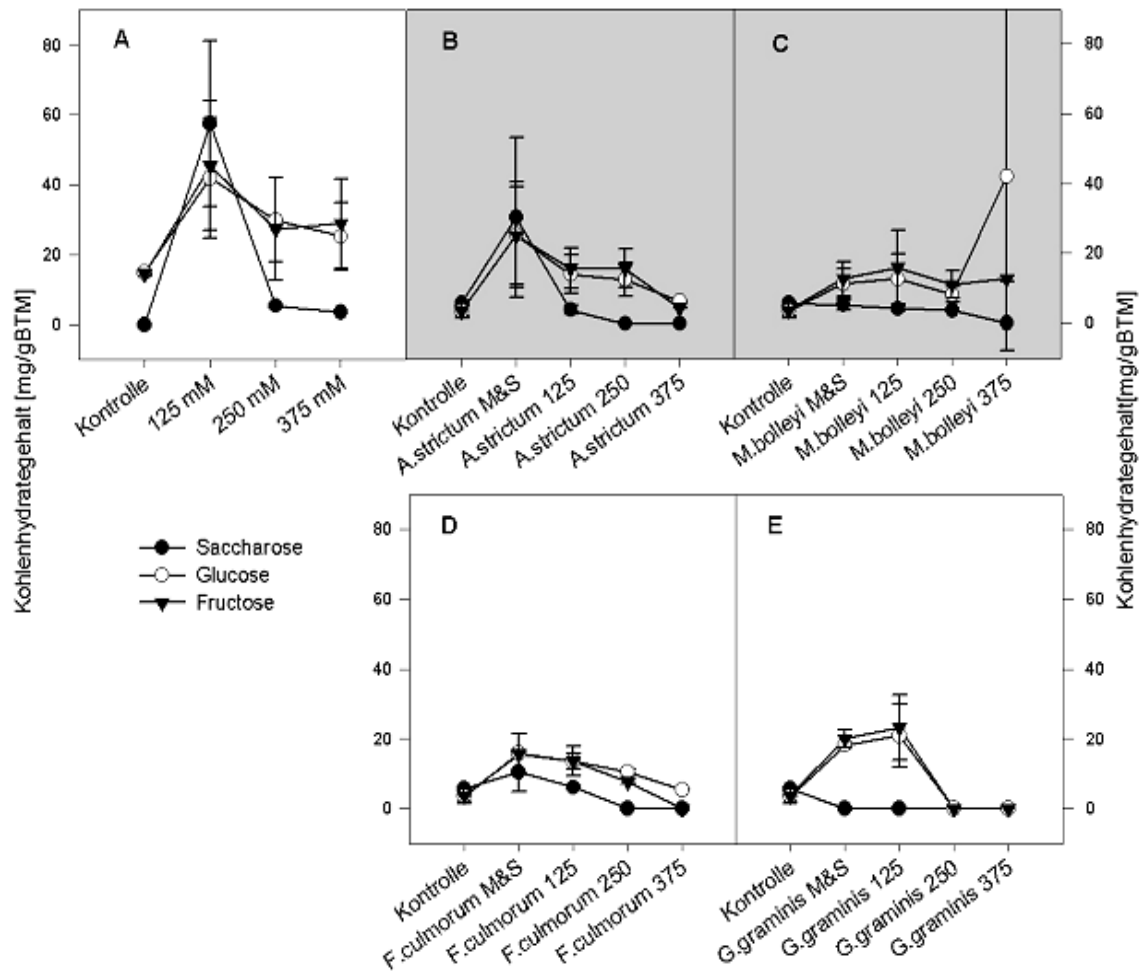


Abb. 3.14 D-Saccharose-, D-Glucose- und D-Fructosegehalte in den Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums (**A**) und / oder einer Inokulation mit endophytischen (*Ac. strictum* TUB6911 und *M. bolleyi* 6930; **B** und **C**; grau markierte Felder) bzw. mit pathogenen (*F. culmorum* TUB6927 und *G. graminis* TUB6935; **D** und **E**; weiße Felder) Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). **M&S** – Murashige & Skoog-Medium ($n = 3$, \pm - Standardabweichung, $p \leq 0,001$)

In dem ohne Pilzinokulation kultivierten Strandhafer wurde sowohl in den Kontrollen als auch bei den mit verschiedenen NaCl-gestressten Pflanzen kein Mannitol nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Wurden *A. arenaria*-Pflanzen mit den Pilzen inokuliert, waren die D-Mannitolgehalte der Kontrollpflanzen höher als in allen anderen untersuchten Ansätzen. Wurde der Strandhafer von *Ac. strictum* besiedelt, wurden bei den ohne Salz kultivierten und mit 125 und 250 mM NaCl gestressten Pflanzen verringerte D-Mannitolmengen detektiert (alle um 1,8 mg/gBTM) (Abb. 3.15). Eine vier Wochen andauernde Kultivierung von *A. arenaria* mit 375 mM NaCl resultierte in einer nicht signifikanten Konzentrationssteigerung von diesem Zuckeralkohol auf 5,4 mg/gBTM (Abb. 3.15).

In den Extrakten aus den mit *M. bolleyi*, *F. culmorum* und *G. graminis* inokulierten und ohne Salz kultivierten Pflanzen konnte Mannitol nicht nachgewiesen werden. Sein Wert stieg bei dem mit *G. graminis* und in 125 mM NaCl kultivierten Strandhafer auf 3,5 mg/gBTM an und lag nach einer Erhöhung der Salzkonzentration erneut in einem nicht messbaren Bereich. Eine Steigerung des Salzgehaltes im Medium auf 375 mM NaCl resultierte bei den mit *M. bolleyi* TUB6930 besiedelten Pflanzen in einer Zunahme der Mannitolkonzentration in den zu vermessenden Proben auf 5,1 mg/gBTM (Abb. 3.15).

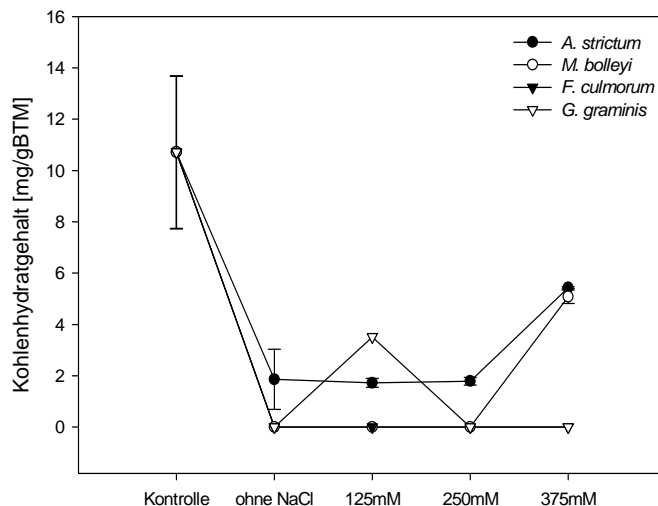


Abb. 3.15 D-Mannitolgehalte von den ohne Pilzinokulation (Kontrolle) bzw. mit den Pilzisolaten besiedelten *A. arenaria*-Pflanzen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des M&S-Mediums und bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). M&S – Murashige und Skoog- Medium (n = 3; \pm - Standardabweichung; $p \leq 0,001$)

3.7 Spezifische Aktivität der Fd-GOGAT von *A. arenaria*

Mit dem unter 2.7.3 beschriebenen Enzymassay wurden die spezifische Aktivität von Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT) sowie die L-Glutamatbiosynthese beim Wachstum von *A. arenaria* unter verschiedenen Bedingungen (Salzstress und / oder Besiedlung mit den Pilzisolaten; s. 2.3.1 A - C) ermittelt. Weiterhin sollte durch die Versuche der Einfluss von Fd-GOGAT auf den Aminosäurenmetabolismus von Strandhafer unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ermittelt werden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde ebenfalls die Abhängigkeit zwischen der L-Glutamatbildung und dem Prozess der L-Prolinbiosynthese berücksichtigt.

Die spezifische Aktivität der Fd-GOGAT war nach der Kultivierung von *A. arenaria* mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen und ohne Pilzbesiedlung nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Kontrollen (1,3 U/mg; Abb. 3.16 A). Die Inokulierung der Pflanzen mit *Ac. strictum* TUB6911 resultierte anfangs in einer Abnahme der spezifischen Aktivität, die bei der Einwirkung von 125 mM NaCl-Stress mit 0,83 U/mg signifikant verschieden gegenüber der Kontrolle (1,2 U/mg) war. Wuchsen die Pflanzen

mit 250 bzw. mit 375 mM NaCl, erfolgte ein Anstieg der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT. Jedoch war der Wert erst bei der höchsten Salzkonzentration (375 mM) signifikant erhöht (1,5 U/mg; Abb. 3.16 B) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Besiedlung der Pflanzen durch *M. bolleyi* TUB6930 resultierte in einer signifikanten Verminderung der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT (1 U/mg) gegenüber der Kontrolle (1,3 U/mg). Auch bei den gleichzeitig in 125 mM NaCl kultivierten Pflanzen sank die spezifische Enzymaktivität auf einen statistisch relevanten Wert von 0,9 U/mg (Abb. 3.16 C). Die Erhöhung der Mediumsalinität auf 250 und 375 mM NaCl hatte dagegen keine weitere Veränderung der Enzymaktivität gegenüber der Kontrolle zur Folge (Abb. 3.16 C).

Die Kolonisierung der *A. arenaria*- Pflanzen mit den beiden pathogenen Pilzisolaten (*F. culmorum* und *G. graminis*) hatte gegenüber den Kontrollen eine geringfügige Veränderungen der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT zur Folge (Abb. 3.16 D und E). Lediglich bei der Besiedlung von Strandhafer durch *F. culmorum* TUB6927 und unter der gleichzeitigen Einwirkung von 375 mM NaCl konnte eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität auf 2,35 U/mg ermittelt werden (Abb. 3.16 D).

L-Glutamatgehalte waren in allen Ansätzen signifikant verringert im Vergleich zu den Kontrollen. In den meisten Fällen stimmten die mit steigendem NaCl-Gehalt gebildeten L-Glutamatmengen mit der Aktivität der Fd-GOGAT überein. Lediglich bei den mit *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 inokulierten Pflanzen, die entweder mit 250 oder 375 mM NaCl gestresst wurden, verringerte sich die Glutamatkonzentration, wogegen die Werte für die spezifische Aktivität des untersuchten Enzyms anstiegen (Abb. 3.16 B und D).

Alle Werte der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT, die zu der graphischen Darstellung herangezogen wurden, sind im Anhang H. 1 einzusehen.

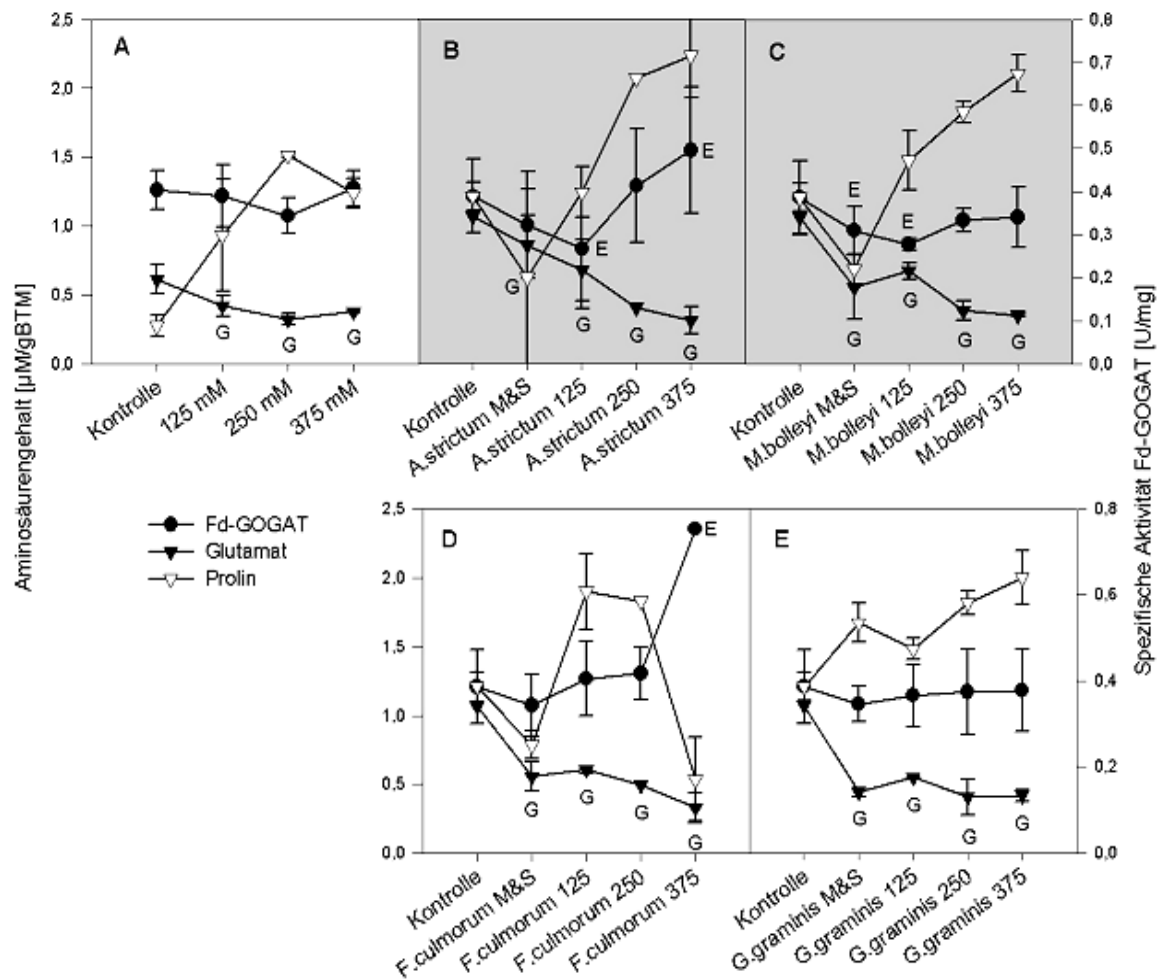


Abb. 3.16 Spezifische Aktivität von Fd-GOGAT in den Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums (A) und / oder einer Inokulation mit endophytischen (*Ac. strictum* und *M. bolleyi*; B und C; grau markierte Felder) bzw. mit pathogenen (*F. culmorum* und *G. graminis*; D und E; weiße Felder) Pilzisolaten, bezogen auf den Proteingehalt. Gezeigt sind ebenfalls die Korrelationen zwischen den L-Glutamat- und L-Prolinkonzentrationen, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). M&S – Murashige & Skoog-Medium. Die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die Salinität des M&S-Mediums in mM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten wurden folgendermaßen bezeichnet: E für die spezifische Aktivität von Fd-GOGAT; G für die L-Glutamatgehalte. (n = 3, \pm - Standardabweichung, $p \leq 0,001$).

Zur Veranschaulichung der Abhängigkeit zwischen der Zunahme von L-Prolin und der Abnahme des L-Glutamatgehaltes wurde in der Abbildung 3.16 auch die von den Wachstumsbedingungen abhängige L-Prolinbildung mit dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die Zunahmen der L-Prolinkonzentration und die gleichzeitigen Verminderungen der L-Glutamatgehalte in einer Wechselbeziehung stehen (Abb. 3.16 A, B, C, D und E). Einzige Ausnahme wurde bei den mit *F. culmorum* inokulierten Pflanzen festgestellt, wo die Steigerung des NaCl-Gehaltes auf 375 mM eine Abnahme von sowohl L-Glutamat- als auch L-Prolinkonzentration zur Folge hatte (Abb. 3.16 D).

3.8 Spezifische Aktivität der P5CS von *A. arenaria* und den untersuchten Pilzisolaten

Mit dem dargestellten gekoppelten GK/GPR-Enzym-Assay (s. 2.7.4) wurden die Auswirkungen von Salzstress und / oder Besiedlung mit den pathogenen bzw. endophytischen Isolaten auf den L-Prolinmetabolismus von *A. arenaria* (s. 2.3.1 A, B und C) sowie von den beiden mituntersuchten Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 (s. 2.6.2) mittels spezifischer Aktivität der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS) ermittelt.

Die Auswertung der spezifischen Aktivitäten der P5CS ergab bei den mit NaCl gestressten Pflanzen (Abb. 3.17 A) sowie bei den Versuchen mit den endophytischen Pilzisolaten (*Ac. strictum* TUB6911 und *M. bolleyi* TUB6930; Abb. 3.17 B und C) signifikant erhöhte Enzymaktivitäten. Wurde *A. arenaria* über vier Wochen mit 250 und 375 mM NaCl im M&S-Medium kultiviert, stieg die spezifische Aktivität der P5CS um jeweils 39 % und 63 % gegenüber dem Kontrollwert an (angegeben als 100 %) (Abb. 3.17 A).

Vier Wochen nach der Inokulierung von Strandhafer mit *Ac. strictum* TUB6911 erhöhte sich die spezifische Enzymaktivität bei den gleichzeitig mit 125 mM NaCl gestressten Pflanzen um 48 % gegenüber der Kontrolle. Wurde *A. arenaria* von *M. bolleyi* TUB6930 besiedelt, zeigten sich signifikante Erhöhungen der spezifischen P5CS -Aktivität bei dem mit 125, 250 und 375 mM NaCl gestressten Strandhafer (jeweils um 65 %, 44 % und 54 % gegenüber der Kontrolle) (Abb. 3.17 B und C).

Wurden die Pflanzen mit den beiden Pathogenen *F. culmorum* und *G. graminis* inokuliert und gleichzeitig mit 125 bzw. 250 mM NaCl gestresst, stieg die P5CS-Aktivität nur gering an. Die Zugabe von 375 mM NaCl zum M&S-Medium resultierte in einer Abnahme der spezifischen Aktivität. In allen Fällen waren die Gehalte jedoch nicht statistisch verschieden (Abb. 3.17 D und E). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die spezifische Aktivität der P5CS bei den mit den Pilzisolaten inokulierten und / oder salzgestressten Pflanzen geringere Werte annahm als bei denen, die ausschließlich mit NaCl (ohne Pilzbesiedlung) gewachsen sind (Abb. 3.17 A bis E).

Die gebildeten L-Prolingehalte (vgl. auch 3.4.1) stimmten bei den salzgestressten Pflanzen (ohne Pilzbesiedlung) mit der spezifischen Aktivität der P5CS überein (3.17 A). Die Erhöhung der Mediumsalinität hatte eine direkte Einwirkung auf die Steigerung der L-Prolinkonzentration in den untersuchten Ansätzen zur Folge. Dabei waren die L-

Prolingehalte in den 250 mM und 375 NaCl Ansätzen, gegenüber den Kontrollpflanzen, signifikant erhöht (vgl. 3.4.1 und Abb. 3.9). Wurde Strandhafer über vier Wochen dem abiotischen Stress ausgesetzt und gleichzeitig von den Pilzisolaten kolonisiert, waren die Prolingehalte, trotz geringerer Enzymaktivitäten, höher als bei den ohne Pilzinokulation kultivierten Pflanzen (Abb. 3.17 A bis E; vgl. 3.4.1).

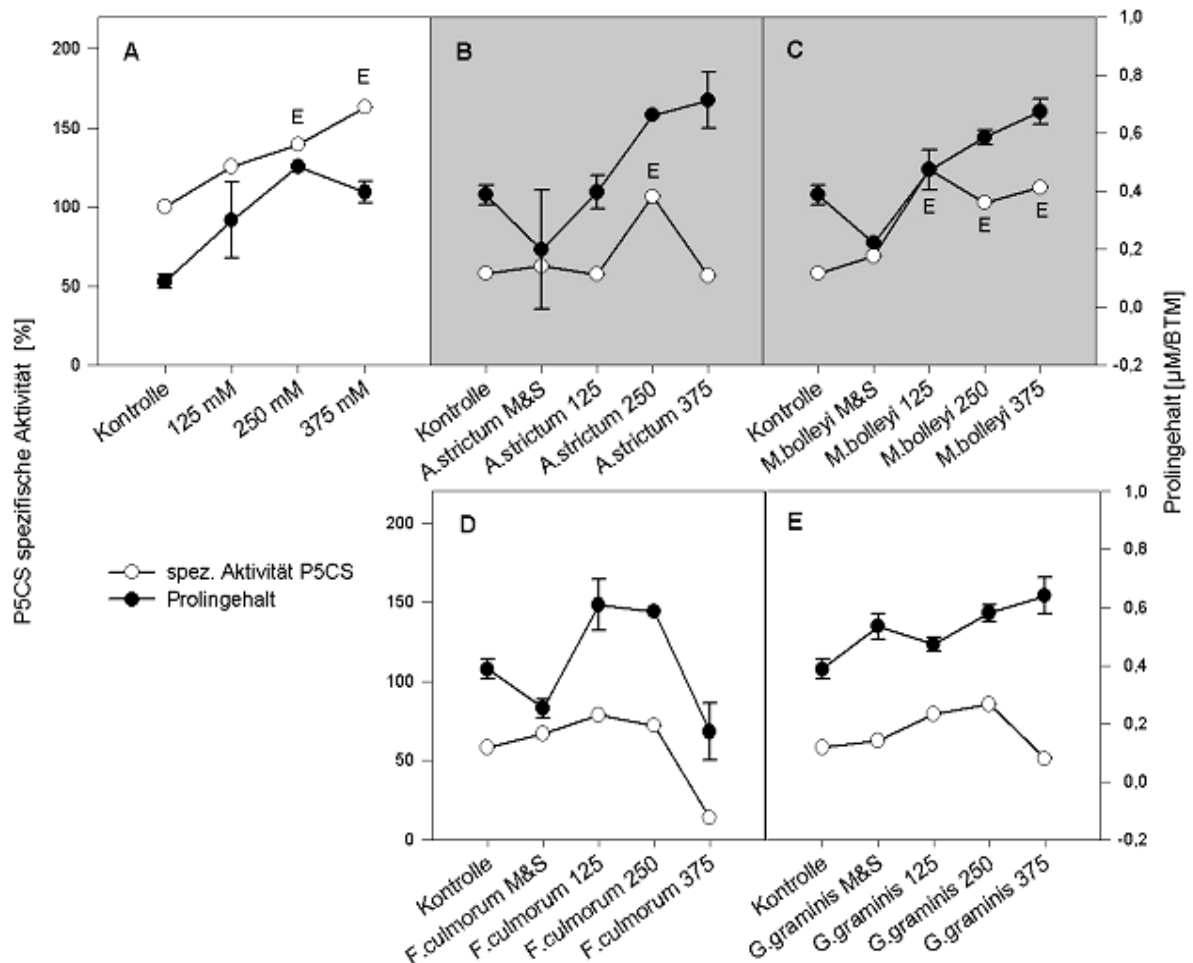


Abb. 3.17 Spezifische Aktivität der P5CS in den Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums (**A**) und / oder einer Inokulation mit endophytischen (*Ac. strictum* TUB6911 und *M. bolleyi* TUB6930; **B** und **C**; grau markierte Felder) bzw. mit pathogenen (*F. culmorum* TUB6927 und *G. graminis* TUB6935; **D** und **E**; weiße Felder) Pilzisolaten. Gezeigt sind ebenfalls die Gehalte an L-Prolin, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Die Werte der spezifischen Aktivität wurden in % ausgedrückt und beziehen sich jeweils auf den Kontrollwert (100 %)

Die Zahlen bei den Pilznamen stehen für die Salinität des Murashige & Skoog- Mediums (M&S) in mM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten wurden folgendermaßen bezeichnet: **E** für die spezifische Aktivität von P5CS.

(n = 3, \pm - Standardabweichung, $p \leq 0,001$).

Die Ermittlung der spezifischen Aktivität von P5CS bei den untersuchten Pilzisolaten *Ac. strictum* TUB6911 und *F. culmorum* TUB6927 ergab nur sehr geringe Werte der spezifischen Aktivität (im Bereich von 10^{-5} U/mg; Daten nicht gezeigt). Ferner konnte kein Einfluss von Salzstress auf die ermittelte Enzymaktivität festgestellt werden.

Alle Werte der spezifischen Aktivität von P5CS bei den *A. arenaria*-Pflanzen und den untersuchten Pilzisolaten, die zu der graphischen Darstellung herangezogen wurden, sind jeweils im Anhang H. 2 und H. 3 einzusehen.

3.9 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

3.9.1 Identifizierung der Pilzisolate mittels 28S-rDNA- und ITS-Region sowie ihre Charakteristika

Wie unter 2.8.1 beschrieben, wurde die Artbestimmung von den vier Pilzisolaten (*Ac. strictum* TUB6911, *F. culmorum* 6927, *M. bolleyi* TUB6930 sowie *G. graminis* TUB6935) u.a. über die 28S-rDNA- und ITS-Region durchgeführt. Nach der PCR mit 28S-rDNA- und ITS-spezifischen Oligonucleotiden (vgl. 2.8.1.2) wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.18) und anschließend direkt sequenziert (AMODIA GmbH; Braunschweig).

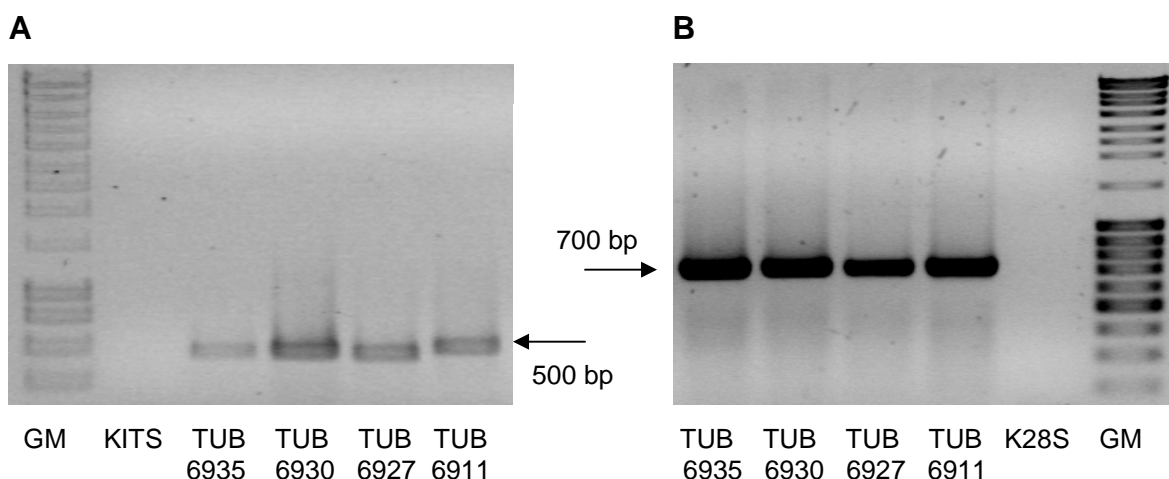


Abb. 3.18 PCR-Produkte, die mittels (A) ITS- und (B) 28S-rDNA-Region spezifischer Primer zur Identifizierung der verwendeten Pilzisolate amplifiziert wurden.

Gel 1,5 % Agarose (w/v); aufgetragene DNA-Menge – 15 µL. TUB – interne Stammsammlung der Technischen Universität Braunschweig; GM – Größenmarker; bp – Basenpaare; KITS – Negativkontrolle interner transkribierender Spacer; K28S – Negativkontrolle 28S-rDNA

Die Analyse der Sequenzen unter Verwendung des BLAST-Programms (Version 2.2.13; National Center for Biotechnology Information; NCBI) ergab, dass die untersuchten Pilzisolat TUB6911, TUB6927, TUB6930 und TUB6935 jeweils folgenden Spezies angehören: *Acremonium strictum*, *Fusarium culmorum*, *Microdochium bolleyi* und *Gaeumannomyces graminis* (Tab. 3.3) Die vollständigen Sequenzen der 28S- und ITS-Region sind im Anhang I. 1 und I. 2 einzusehen. Die Resultate der BLAST-Suche mit den erhaltenen 28S-rDNA und ITS-Sequenzen, die eine Artbestimmung von den ausgewählten Pilzisolaten ermöglichte, sind im Anhang J. 1 und J. 2 einzusehen.

Tab. 3.3 Resultate der BLAST-Suche mit den erhaltenen 28S-rDNA und ITS-Sequenzen, die u.a. eine Artbestimmung von den ausgewählten Pilzisolaten ermöglichte. Die molekularbiologische Analyse erfolgte über die Bestimmung der 28S-rDNA- und ITS-Region mit spezifischen Primern (s. 2.8.1). Angegeben sind: die Art, die Homologierate zu der vorgefundenen GenBank-Sequenz [%] sowie die GenBank accession No.

TUB-Katalog-Nr.	Art-Zuordnung über die 28S-rDNA Region, Homologierate und die zugehörige GenBank accession No.	Art-Zuordnung über die ITS-Region, Homologierate und die zugehörige GenBank accession No.	Pilzisolat identifiziert als:
6911	<i>Acremonium strictum</i> ; 99% GenBank accession No.: AY138455	<i>Acremonium strictum</i> ; 99% GenBank accession No.: AY14439	<i>Acremonium strictum</i>
6927	<i>Fusarium cerealis</i> ; 100% GenBank accession No.: AF006321 <i>Gibberella zeae</i> ; 99% GenBank accession No.: AY188924 <i>Fusarium culmorum</i> ; 99% GenBank accession No.: AF006322	<i>Fusarium culmorum</i> ; 99% GenBank accession No.: AF484956	<i>Fusarium culmorum</i>
6930	Uncultured compost fungus clone 2F10; 99% GenBank accession No.: DQ365405 <i>Monographella nivalis</i> ; 96% GenBank accession No.: AF452030	<i>Microdochium bolleyi</i> ; 97% GenBank accession No.: AJ279475	<i>Microdochium bolleyi</i>
6935	<i>Gaeumannomyces graminis</i> ; 99% GenBank accession No.: AF362556	<i>Gaeumannomyces graminis</i> ; 95% GenBank accession No.: AY428777	<i>Gaeumannomyces graminis</i>

3.9.2 Regulation der Genexpression von *AaPDH*

3.9.2.1 Amplifikation von *AaPDH* mit dem neu entwickelten Primerpaar

Die Sequenz der putativen Prolindehydrogenase (PDH) aus *Oryza sativa* cv. „*japonica*“ (GenBank accession No. NM197664) fungierte als Basis für die Suche nach Homologien unter den Expressed Sequence Tags (ESTs) aus den monokotyledonen Pflanzen (2.8.2.2). Die vorgefundenen Homologien zwischen den ESTs bildeten eine Grundlage für die Konstruktion von neuen Primern, die anschließend eine Amplifikation der Prolindehydrogenase aus *A. arenaria* (*AaPDH*) ermöglichten.

Die Sequenzen von den neu entwickelten Oligonucleotiden waren (s. auch Tab. 2.9):

Forward Primer **GP240**: 5'- CAGGASACCCACGACTGCTACAAC – 3'

Reverse Primer **GP310**: 5'- GTACTTGCTCACCTGGAA – 3'

Die Primer wurden bei der PCR verwendet, die zur Amplifikation eines Fragmentes des *AaPDH*-Gens von *A. arenaria* diente (s. 2.8.2.4 und Tab. 2.9). 15 µL des PCR-Produktes wurden zur Kontrolle in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.19). Das Amplifikat lieferte eine Bande, die eine Länge von ca. 200 bp aufwies. Eine genaue Information über die Größe und die Sequenz des Amplifikates lieferte die Klonierung des PCR-Produktes in *E. coli* (s. 2.8.2.5) und seine anschließende Sequenzierung (s. 2.8.2.9 und 3.9.2.3).

Die Amplifikation der aus *A. thaliana* isolierten DNA mit dem neu für *A. arenaria* entwickelten Primerpaar ergab kein Produkt (nicht gezeigt).

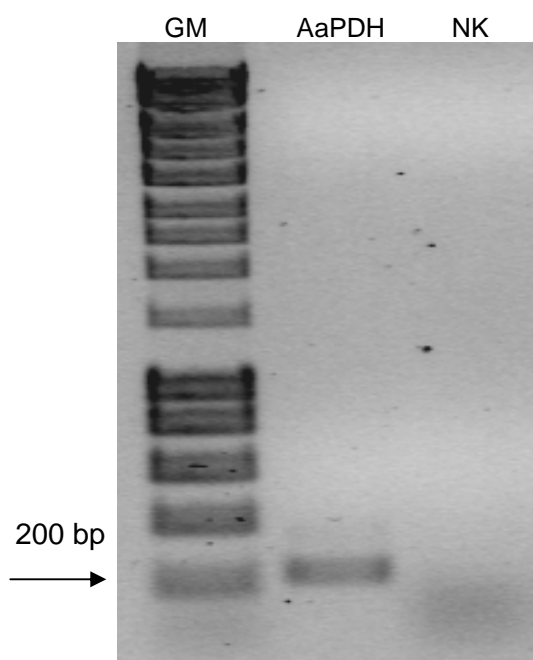


Abb. 3.19 PCR-Produkt, das nach einer Amplifikation der genomischen DNA aus *A. arenaria* mit dem neuen Primerpaar GP240 – GP310 entstanden ist.

GM – Größenmarker; AaPDH – PCR-Produkt; NK – Negativkontrolle; bp - Basenpaare

3.9.2.2 Insertkontrolle sowie die PCR mit der Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Qualität von klonierter DNA, ihrer Menge sowie Insertgröße wurden die verdauten Plasmide (s. 2.8.2.7) elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.20).

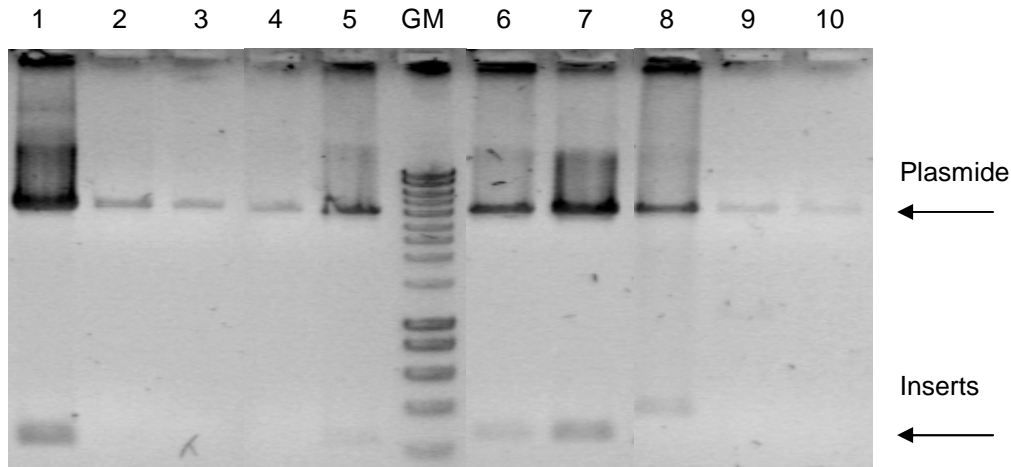


Abb. 3.20 Überprüfung der DNA-Qualität, -Menge sowie Insertgröße nach einem Restriktionsverdau der Plasmide mit EcoRI. Die auf das 1,2 % (w/v) Agarosegel aufgetragene Klon-DNA (jeweils 15 μ L) wurden von 1 bis 10 durchnummeriert. GM – Größenmarker; bp - Basenpaare

Die Plasmide wurden ebenfalls bei einer PCR-Reaktion eingesetzt (s. 2.8.2.8), die eine Information über die Amplifizierbarkeit des Inserts mit dem neuen Primerpaar GP240 – GP310 lieferte. Die Auswertung der PCR ergab, dass lediglich die Klone mit den Nummern 1, 2, 6, 7, und 10 ein reines PCR-Produkt richtiger Größe lieferten (Abb. 3.21). Zur Sequenzierung der Plasmid-DNA (s. 2.8.2.9) und einem anschließenden Datenbankvergleich wurden die Klone mit der Nr. 1, 2, 6, und 7 herangezogen (s. 3.9.2.3).

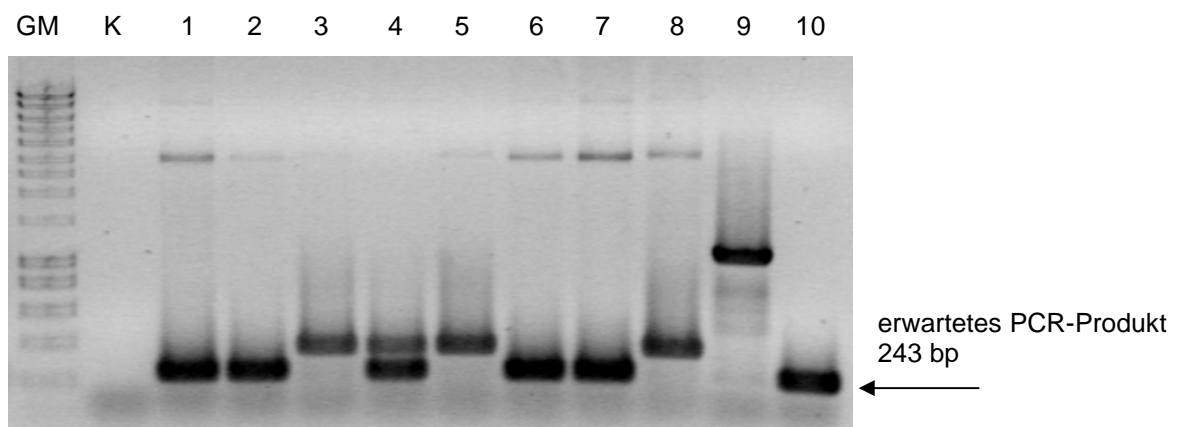


Abb. 3.21 Ergebnis der PCR-Reaktion mit den neuen Primern GP240 und GP310 zur Amplifikation der PDH-Region von *A. arenaria*. Als Template diente jeweils 1 μ L der Plasmid-DNA. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,2 %iges (v/w) Agarosegel aufgetragen (jeweils 15 μ L) und von 1 bis 10 durchnummeriert. GM – Größenmarker; bp - Basenpaare

3.9.2.3 DNA-Sequenzanalyse der klonierten PCR-Produkte und die Datenbankanalyse

Vier Plasmide mit Inserts richtiger Größe (1, 2, 6 und 7; Abb. 3.21) wurden nach dem Klonieren sequenziert. Die Sequenzen der Klone sind in der Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.4 Sequenzanalyse der Klone 1, 2, 6 und 7 sowie die Fragmentlängen in Basenpaaren (bp).

Klon-Nummer	Zugehörige DNA-Sequenz	Länge in Basenpaaren (bp)
1	GAGACCCACGACTGCTACAACGGVgCGCCGCCiTCCTCCTGGAGCGCGTC CGCCTCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTTGCCACCCACAACGTGgaGTCGGG CCAGCTCGCGGCCGCGAGGGCGCAGGAGCTGGGCATCGGCAAGGGGGA CCGGAACCTGCAGTTCGCGCAcTGATGGGCATGGCTGACGGGCTTTCCCT GAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCAGGtagcAAgAA	235
2	GAATTCGGCTTCGGAACCCACGACTGCTACASKNgCTGCGCGCCTTCCTCC TGGAGCGCGTCCGCCTCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTTGCCACCCACAAC GTGAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGCGAGGGCGCAGGAGCTGGGCATCG GCAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCASTGATGGGCATGGCTGAC GGGCTTTCCCTGAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCAGgTGAGCAAGTA CAA	248
6	gaaTTCGGCTTCAGGGACCCACGACTgttAVMMcgGCTGCGCgCCTTCCTCCT GGAGCGCGTCCGCCGCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTCGCCACCCACAAC GTGAGTCCGGCCAGCTCGCGGTGGCGAGGGCGCAGGAGTTGGGCATCGG CAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCASTGATGGGCATGGCTGATGG GCTGTCCCTGGGCCTCCGAAACGCCGGGTTCAGkTga gCAAGTACAA	249
7	GaATTCGGCTTCAGGGAGACCCACGACTgMTatMaCgGCTGCGCGCCTTCCT CCTGGAGCGCGTCCGCCTCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTTGCCACCCACA ACGTGAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGCGAGGGCGCAGGAGCTGGGCATC GGCAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCASTGATGGGCATGGCTGA CGGGCTTTCCCTGAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCaGgTGAGCA AGTACAA	251

Die in den NCBI-Datenbanken durchgeführte BLAST-Suche mit der erhaltenen Sequenz des Klons 2 ergab an der ersten Stelle eine 82 %ige Homologie zu der putativen Prolinoxidase aus *Oryza sativa*, GenBank accession Nummer: NM197664 (Abb. 3.22). Die BLAST-Ergebnisse sind im Anhang J. 5 einzusehen.

Query	16	ACCCACGACTGCTACASKNGCTGCGC-GCCTTCCTCCTGGAGCGGTCCGCTCGGGTCC	74
Sbjct	1084	ACCCACGACTGCTACAACGGCTGCGCCGCTTCCTCCTCGACCGGTCCGCCGCGGCC	1143
Query	75	GCCTCCCTGATGCTTGCCACCCACAACGT-GAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGAGGGCG	133
Sbjct	1144	GCCGCCGTGACGCTCGCCACGCACAACGTGAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGAGGGCG	1203
Query	134	CAGGAGCTGGGCATCGGCAAGGGGG---ACCGGAACCTGCAGTTCGCGCAS-TGATGGGC	189
Sbjct	1204	CTGGAGCTCGGCATCGGCGGCGGCGGCGACCGCGGCTGCAGTTCGCGCAGCTGATGGGC	1263
Query	190	ATGGCTGACGGGCTTTCCCTGAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCAGGTGAGCAAGTAC	246
Sbjct	1264	ATGGCGGATGGCCTCTCGCTCGGCCTCCGCAACGCCGGGTTCAGGTGAGCAAGTAC	1320

Abb. 3.22 BLAST-Suche mit der zu Basis stehenden Sequenz von Klon 2 (NCBI-Datenbanken). Das Alignment ergab eine 82 %ige Homologie zu der putativen Prolinoxidase aus *O. sativa* (GenBank accession No. NM197664).

Query – die Sequenz von Klon 2; *Subject* – Sequenz der putativen Prolinoxidase aus *O. sativa*.

3.9.2.4 Optimierung von Primern

Die Sequenzen der Klone 1, 2, 6 und 7 (s. Tab. 3.4) sowie die Sequenz der putativen Prolinoxidase aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. NM197664) (s. Anhang I. 3) wurden in einem Alignment (GeneDoc-Programm Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) miteinander verglichen (Abb. 3.23). Anschließend erfolgte die Optimierung des Primerpaars GP240 und GP310 (vgl. 2.8.2.9).

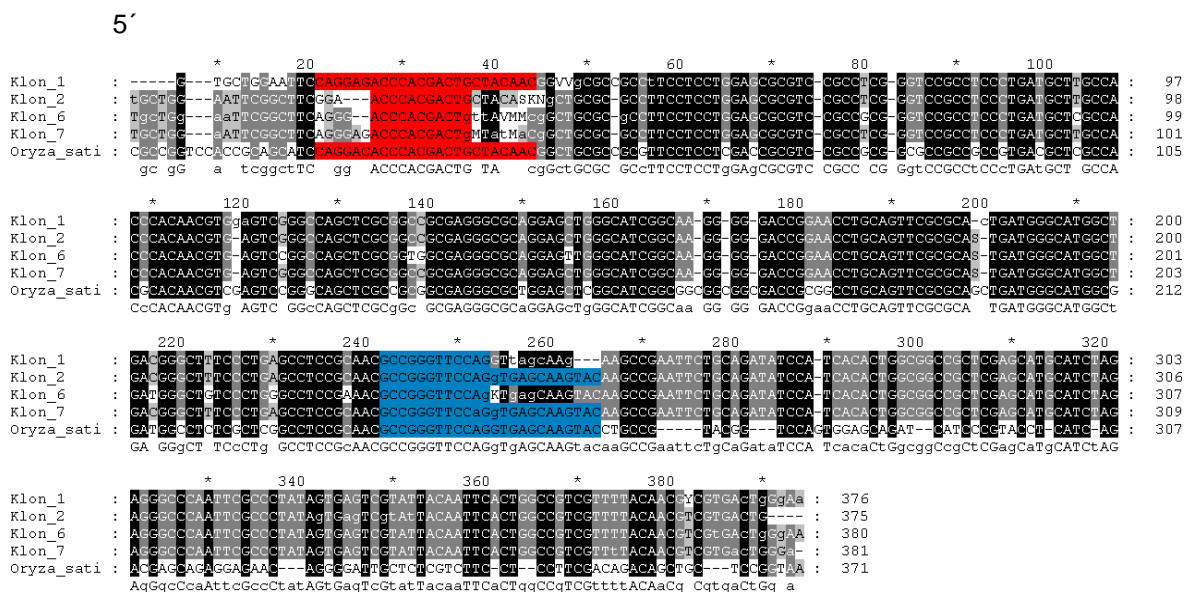


Abb. 3.23 Alignment von Klon- und Prolinoxidasesequenz aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. NM197664) zum Vergleich von erhaltenen Klonsequenzen sowie zur Optimierung von Primern, die bei der Amplifikation von *AaPDH* verwendet wurden. Die modifizierten Fragmente mit den Positionen 21 – 44 bp (*GP240N*; rot markiert) und 242 – 265 bp (*GP310N*; blau markiert) wurden als *forward* und *reverse* Primer bei der RT-PCR (s. 2.8.3) eingesetzt.

Das Alignment wurde durchgeführt nach der manuellen Eingabe in das Programm GeneDoc (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997).

Das Primerpaar wurde nach dem dargestellten Alignment folgendermaßen modifiziert:

Alter forward Primer GP240:	5' - CAGGA(GC)ACCCACGACTGCTACA - 3'
Modifizierter Primer GP240N :	5' - CAGGAGACCCACGACTGCTACAAC - 3'
Alter reverse Primer GP310:	5' - GTACTTGCTCACCTGGAA - 3'
Modifizierter Primer GP310N :	5' - GTACTTGCTCACCTGGAACCCGGC - 3'

3.9.3 Regulation der *AaPDH*-Expression nach langzeitiger Salzstresseinwirkung oder nach der Inokulation mit den Pilzisolaten

Aufgrund der RT-PCR-Ergebnisse (s. 2.8.3) konnte bei *A. arenaria* keine eindeutige Aussage über die Regulation der *AaPDH*-Expression nach einem 4 Wochen andauernden NaCl-Stress (125, 250 und 375 mM; vgl. 2.3.1 D) festgestellt werden. Ferner ergaben die Resultate von den mit *Ac. strictum* TUB6911 oder *F. culmorum* TUB6927 inokulierten Pflanzen (s. 2.3.1 D) ebenfalls keinen eindeutigen Einfluss auf das untersuchte Gen. Die Bandenstärke der mit dem *AaPDH*-spezifischen Primerpaar (GP240N – GP310N; s. 3.9.2.4) amplifizierten cDNA-Produkte (s. 2.8.3.7; Ergebnis nicht gezeigt) fiel für die untersuchten Parallelansätze so unterschiedlich aus, dass eine Semiquantifizierung nach einem Vergleich mit den Referenzgenen nicht möglich war.

3.9.4 Regulation der *AaPDH*-Expression nach kurzzeitiger Salzstresseinwirkung

Bei dem dargestellten Versuch wurde *A. arenaria*, wie unter 2.3.2 beschrieben, über 48 h mit 250 mM NaCl im M&S-Medium gestresst und danach über 6 h rehydriert (Erholungsphase). Das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR, bei der die cDNA aus Strandhafer mit spezifischen Primern für die *AaPDH*, *18S-rRNA* sowie *β-Tubulin* – Gene in jeweils zwei Parallelen amplifiziert wurde (vgl. 2.8.3.7) ist aus der Abbildung 3.24 ersichtlich.

Die Auswertung der semiquantitativen RT-PCR deutet darauf hin, dass eine Behandlung von Strandhafer über 48 h mit 250 mM NaCl eine Runterregulation der *AaPDH*-Expression zur Folge hatte (Abb. 3.24; Lanes 13 – 14). Wurden die Pflanzen danach über 6 h rehydriert, konnte eine deutliche Zunahme der *AaPDH*-Expression beobachtet werden. Dies zeigte sich in einer deutlich stärkeren Bandenausprägung im Vergleich zu den mit NaCl-gestressten Pflanzen (Abb. 3.24; Lanes 15 – 16). Das Ergebnis dieser Untersuchung lieferte somit einen eindeutigen Beweis für den Einfluss von Salzstress auf

die Regulation der *AaPDH*-Expression bei kurzzeitig (hier über 48 h) andauerndem NaCl-Stress.

Bei der Auswertung der Bandenstärke von den mituntersuchten Haushaltsgenamplifikaten (s. 2.8.3.7) konnte festgestellt werden, dass die Expression des *18S-rRNA*-Gens vom Salzstress unbeeinflusst blieb (Abb. 3.24; Lanes 3 – 6). Lediglich die in Lane 3 der Abbildung 3.23 vorhandene DNA-Bande wies eine stärkere Ausprägung als die anderen *18S-rRNA*-Amplifikate auf, was auf ein Artefakt zurückschließen lässt.

Die Untersuchung des β -*Tubulin*-Genes wies dagegen auf eine Regulation der Expression von diesem Gen unter den gewählten Wachstumsbedingungen hin (Abb. 3.24; Lanes 8 – 11). Das *18S-rRNA*-Gen erwies sich in den durchgeführten Experimenten somit als ein besser geeigneter externer Standard im Vergleich zum mituntersuchten β -*Tubulin*-Gen.

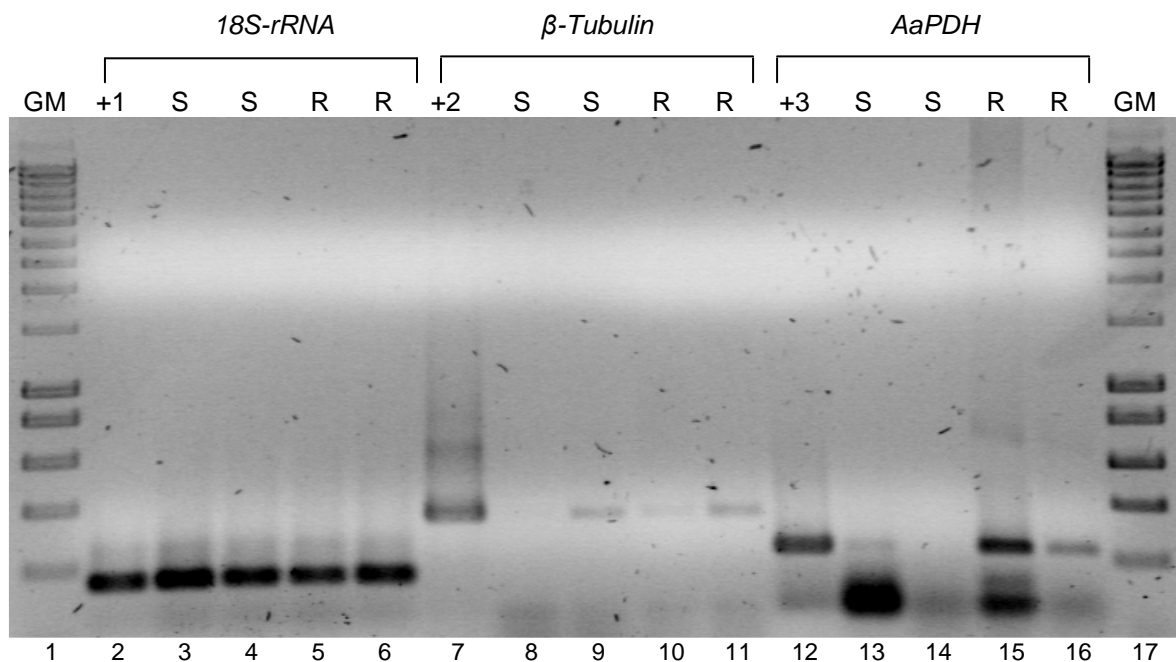


Abb. 3.24 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR, bei der die cDNA aus *A. arenaria* mit spezifischen Primern für die *AaPDH*, *18S-rRNA* sowie β -*Tubulin* – Gene in jeweils zwei Parallelen amplifiziert wurde. Gel - 1,5 % Agarose (w/v). Von den Positivkontrollen wurden jeweils 7 μ L, von den RT-PCR-Amplifikaten jeweils 15 μ L auf das Gel aufgetragen.

+1 – Positivkontrolle *18S-rDNA* (Lane 2); **+2** – Positivkontrolle β -*Tubulin* (Lane 7); **+3** – Positivkontrolle *AaPDH* (Lane 12); **S** – Pflanzen gestresst über 48 h mit 250 mM NaCl im M&S-Medium; **R** – Pflanzen gestresst über 48 h mit 250 mM NaCl im Murashige & Skoog-Medium (M&S) und anschließend über 6 h rehydriert (*recovery*-Pflanzen); **GM** -Größenmarker.

3.9.5 Analyse der 18S-rRNA und β -Tubulin-Amplifikate

Die PCR-Produkte (s. 2.8.3.9) wurden in einem 1,5 %igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.25 A und B). Das 18S-rRNA-PCR-Produkt lieferte eine Bande, die eine Größe von 152 bp aufwies. Das β -Tubulin-Amplifikat hatte eine Länge von 327 bp. Die Sequenzen der beiden Amplifikate sind jeweils unter I. 7 und I. 8 (Anhang) einzusehen.

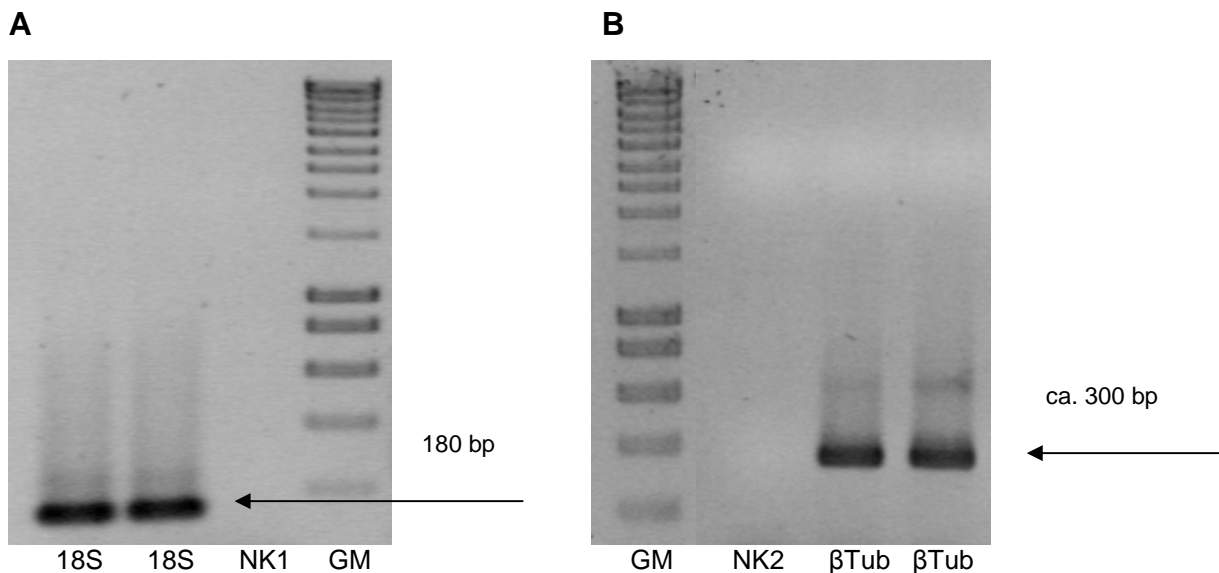


Abb. 3.25 Ergebnis der PCR mit den Primern zur Amplifikation der 18S-rDNA (A) und β -Tubulin-Region (B) bei *A. arenaria* (s. 2.8.3.9).

18S – mit den 18S-rDNA-Primern amplifiziertes PCR-Produkt (s. Tab. 2.11); **β -Tub** – mit den β -Tubulin-Primern amplifiziertes PCR-Produkt (s. Tab. 2.11); **NK1** – Negativkontrolle 18S-rDNA; **NK2** – Negativkontrolle β -Tubulin; **GM** - Größenmarker

3.9.6 Sequenz- und Datenbankanalyse

3.9.6.1 Sequenzanalyse des AaPDH-RT-PCR-Produktes

Die Sequenzanalyse von dem Fragment des PDH-Gens von *A. arenaria*, das in der RT-PCR mit dem Primerpaar GP240N – GP310N und der cDNA als Template amplifiziert wurde (s. Tab. 2.11), ergab nach der BLAST-Suche in den NCBI-Datenbanken, ähnlich wie bei der Analyse der Klone (s. 3.9.2.3 und Abb. 3.22), eine 82 %ige Homologie zu der putativen Prolinoxidase aus *O. sativa* (GenBank accession No. NM197664). Darüber hinaus wurde in einem Alignment (GeneDoc; Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) die Homologie zu den Sequenzen der Klone 1, 2, 6 und 7 bestätigt (Abb. 3.26).

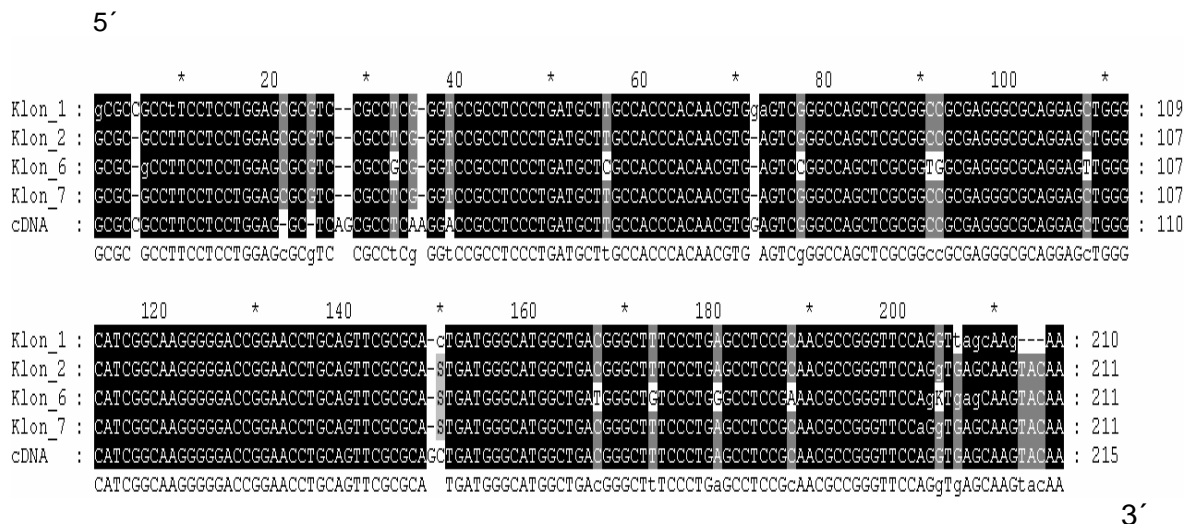


Abb. 3.26 Alignment von Klonsequenzen (s. Tab. 3.4) und der *AaPDH*-Sequenz, die in der RT-PCR mit dem Primerpaar GP240N – GP310N und mit der cDNA als Template amplifiziert wurde (s. Tab. 2.11). Das Alignment wurde durchgeführt nach der manuellen Eingabe in das Programm GeneDoc (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997).

3.9.6.2 Sequenzanalyse der genomischen β -Tubulin- und 18S-rDNA-Produkte

Die BLAST-Analyse mit der genomischen Sequenz des β -Tubulinfragmentes aus *A. arenaria* (s. 2.8.3.9 und Anhang J. 6) ergab Homologien zu den Sequenzen der β -Tubulin-Gene aus vier monokotyledonen Pflanzen (*Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Eleusine indica* und *Zea mays*). Dies konnte auch in einem Alignment (GeneDoc; Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997) mit den für die Primerkonstruktion verwendeten β -Tubulinsequenzen aus monokotyledonen Pflanzen (s. Tab. 2.10 und Anhang I. 6) bestätigt werden (Abb. 3.27).

Die BLAST-Analyse mit der genomischen Sequenz des 18S-rDNA-Fragmentes aus *A. arenaria* ergab Homologien zu den Sequenzen der 18S-rDNA aus verschiedenen monokotyledonen Pflanzen (s. 2.8.3.9 und Anhang J. 7).

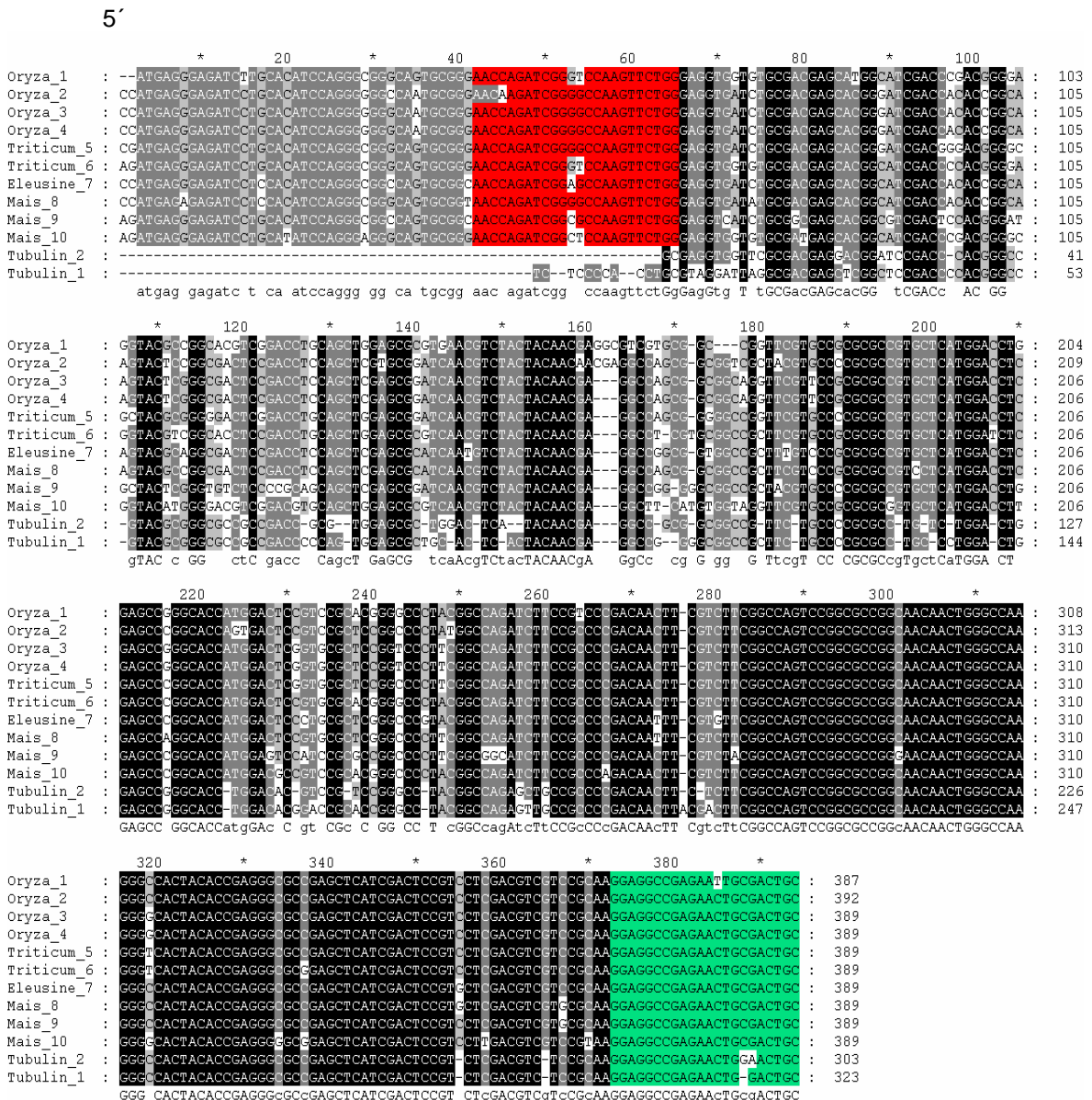


Abb. 3.27 Alignment von β -Tubulin-Sequenzen aus monokotyledonen Pflanzen (vgl. Tab. 2.10 und Anhang I. 6), die zur Primerkonstruktion herangezogen wurden, mit den beiden sequenzierten β -Tubulin-Amplifikaten (Tubulin_1 und Tubulin_2) von *A. arenaria* (s. 2.8.3.9). Zur Veranschaulichung wurden die Sequenzen von den bei der PCR und RT-PCR eingesetzten β -Tubulin-Primern farbig markiert: *forward Primer* (Position 42 – 65; rot markiert) und *reverse Primer* (Position 373 – 394; grün markiert). Konservierte Bereiche sind schwarz markiert. In der Abbildung wurden lediglich Ausschnitte aus den ca. 1300 bp langen β -Tubulin-Sequenzen der monokotyledonen Pflanzen dargestellt. Das Alignment wurde durchgeführt nach der manuellen Eingabe in das Programm GeneDoc (Version 2.6.002; NICHOLAS *et al.* 1997).

3.9.7 Datenbankvergleich von pflanzlichen PDH-Proteinen

Nach dem Vergleich der Proteinsequenz der putativen Prolindehydrogenase aus *Oryza sativa* (GenBank accession Nummer: NM197664; s. Anhang I. 4) mit den Datenbanken (BLAST) konnte eine jeweils 50 %ige Homologie zu der Prolindehydrogenase aus *Glycine*

max (GenBank Accession No. AAR86686.1), 49 %ige zu der Prolindehydrogenase aus *Medicago sativa* (GenBank Accession No. AAT45085.1), 45 %ige zu der Prolindehydrogenase / -Oxidase aus *Nicotiana tabacum* (GenBank Accession No. AAT57675.1) sowie eine 48 %ige Homologie zu der Prolindehydrogenase aus *A. thaliana* (GenBank Accession No. NP_198687.1) festgestellt werden. Das Ergebnis dieser BLAST-Analyse ist im Anhang J. 4 einzusehen.

4. Diskussion

4.1 *Ammophila arenaria* und die mit der Pflanze assoziierten Pilze

Wenig ist bekannt über die mit *A. arenaria* vergesellschafteten Pilze. Die bisherigen Studien beschreiben vorwiegend die in der Rhizosphäre lebenden bzw. mit den Wurzeln assoziierten Mikroorganismen im Hinblick auf ihre parasitäre Einwirkung auf die Strandhaferbestände. Die vorliegende Arbeit liefert die ersten Hinweise über die mögliche Zusammensetzung der mit den *A. arenaria*-Pflanzen assoziierten Pilzgemeinschaft sowie den Status der Isolate *in planta*.

4.1.1 Zu den aus *A. arenaria* isolierten Pilzen

Aus den 113 in der vorliegenden Arbeit aus gesunden *A. arenaria*-Pflanzen isolierten Pilzisolaten wurden 76 Stämme aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften identifiziert. Die Kultivierung der Pilze auf einem nährstoffarmen Medium (hier KM-Medium; s. Tab. 2.1) begünstigt die Sporulation der Pilze und ermöglicht infolgedessen ihre Identifizierung (s. 2.1.1). Die Isolate wurden demnach 19 unterschiedlichen Genera zugeordnet (s. 3.1.1). Die häufigsten Vertreter gehörten dabei den Gattungen *Fusarium* (15 %), *Microdochium* (11 %), *Phoma* (11 %) und *Acremonium* (7 %) an (vgl. Abb. 3.1). Es wurden gleichzeitig u.a. *Ulocladium* spp., *Epicoccum* spp., *Cladosporium* spp., *Phialophora* spp. oder *Alternaria* spp. in den Strandhaferpflanzen vorgefunden (s. Abb. 3.1). DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* (1995) untersuchten die Zusammensetzung der in der Rhizosphäre von *A. arenaria* koexistierenden Gemeinschaft von kultivierbaren bodenbürtigen Pilzen sowie Nematoden. Mit Hilfe der CCA- (*canonical correspondence analysis*) und TWINSpan- (*two-way indicator species analysis*) Analyse wurden 47 verschiedene Pilzarten und 10 parasitäre Nematodenspezies identifiziert. 18 der vorgefundenen Pilzisolat wurden von DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* (1995) als Pflanzenpathogene (z.B. *Fusarium culmorum* und *Microdochium bolleyi*), vier als Samen- (*Chaetomium* spp.) bzw. schwache Pathogene und 25 Spezies als Saprophyten (z.B. *Penicillium* spp., *Acremonium strictum*, *Trichoderma harzianum* oder *Nectria inventa*) identifiziert. Besonders oft fanden sich in den Strandhaferwurzeln die Pathogene *Fusarium culmorum*, *Phoma exigua* und *Microdochium bolleyi* sowie die saprophytischen Pilze der Gattung *Penicillium*, *Trichoderma harzianum* sowie *Fusarium oxysporum*.

DE ROOIJ-VAN DER GOES (1995) liefern die Informationen über die in der Rhizosphäre von *A. arenaria* lebenden Pilze. In der vorliegenden Arbeit dagegen liegen Resultate vor, die aufgrund einer Untersuchung von sowohl unter- als auch oberirdischen Strandhaferteilen

gewonnen wurden und somit die ersten Hinweise über die möglichen Assoziationen von *A. arenaria* mit den Pilzen liefern.

1997 wendeten KOWALCHUK *et al.* eine kultivierungsunabhängige Technik an und untersuchten mittels 18S-rRNA-Analyse und denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) die Pilze, die die Wurzeln von *A. arenaria* infizieren. Da jedoch die 18S-rRNA-Region nicht genügend phylogenetische Information liefert (KOWALCHUK, 1999) und die Datenbanken zur Auswertungszeit nicht ausreichend mit den Sequenzen ausgestattet waren, war die vollständige Zuordnung der Pilzisolat nicht möglich. Die 18S-rRNA PCR-DGGE bestätigte zwar das Vorhandensein der Gattungen *Phoma* und *Microdochium* in den *A. arenaria*-Wurzeln, die Existenz von anderen potentiellen Pilzgenera, die von DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* (1995) nachgewiesen wurden, fand mit dieser Technik dagegen keine Bestätigung (KOWALCHUK *et al.* 1997). Die gleiche Methode wurde verwendet, um die arbuskuläre Mykorrhiza- (AM) Gemeinschaft von Strandhafer zu untersuchen. Die identifizierten Spezies gehörten den Gattungen *Glomus* und *Scutellospora* an (KOWALCHUK *et al.* 2002). Die von KOWALCHUK *et al.* (1997) angewendete Methode erwies sich somit als unzureichend für die Identifizierung der Pilze. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Artbestimmung der ausgewählten vier Pilzisolat (s. 3.1.2) eine Verbindung aus einer morphologischen und einer molekularbiologischen Untersuchung herangezogen. Die letzte basierte dabei auf der Bestimmung der 28S-rRNA- und ITS-Region. Die beiden Regionen wurden gewählt, da sie in Verbindung eine Identifizierung von Gattungen, Arten und Stämmen der untersuchten Pilze ermöglichen (s. 1.7 und 2.8.1) (ZUCCARO, 2004; MITCHELL & ZUCCARO, 2006). Die Ermittlung der Pilzgattung bei den Isolaten erfolgte aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften (vgl. 2.2.1).

Die Assoziation der zum Zeitpunkt der Probenahme mit *A. arenaria* vergesellschafteten Pilze kann nach DE BARY (1879) als Symbiose bezeichnet werden, die das Zusammenleben von Organismen unterschiedlicher Spezies beschreibt. Da die Pilze aus gesunden Strandhaferpflanzen nach einer Oberflächensterilisation isoliert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sie zum Zeitpunkt der Probenahme den „Endophyten“-Status besaßen und mit der Pflanze in Symbiose lebten. Nach PETRINI (1991), SCHULZ *et al.* (1998) und SCHULZ & BOYLE (2005) werden als Endophyten alle Organismen genannt, die in einem bestimmten Lebensabschnitt ihres Lebenszyklus das Innere der Wirtspflanze besiedeln, ohne Krankheitssymptome hervorzurufen. Die Ergebnisse zeigten (s. Tab. 3.2), dass sowohl pathogene als auch nicht pathogene Pilze zur gleichen Zeit eine gesunde Pflanze besiedelten, was auch von SCHULZ *et al.* (1998) berichtet wurde. Die Pflanzen besiedelnden Pilze bilden oft eine heterogene Gruppe und besitzen unterschiedliche

Strategien, um die Pflanzen zu kolonisieren. Die Tatsache, dass der Pilz einer bestimmten Gattung oder Art angehört bedeutet jedoch nicht unbedingt, dass er sich als Endophyt oder Pathogen verhalten muss (PETERS *et al.* 1998). Diese These wurde auch in den Reinfektionsversuchen zu den Interaktionen zwischen *A. arenaria* und den Pilzen bestätigt (vgl. 2.2.2 und Tab. 3.2). In diesen Versuchen wurde der Status der aus Strandhafer isolierten Stämme sowie ihr Potential die Pflanzen zu infizieren getestet. Obwohl alle Pilze aus gesundem Strandhafer isoliert wurden (vgl. 3.1.1), erwiesen sich bei der Versuchsauswertung 11 Isolate als pathogen (vgl. Tab. 3.2). Von *Alternaria* spp. ist es z.B. bekannt, dass sie saprophytisch, pathogen aber auch endophytisch leben können (WEBSTER, 1983). In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich die isolierten *Alternaria*-Pilze, außer einer Ausnahme, als endophytisch (vgl. Tab. 3.2). In der Darstellung von WEBSTER (1983) werden z.B. *Phoma* spp. als Pathogene eingestuft. Dies wurde auch in den durchgeführten Versuchen bestätigt (s. Tab. 3.2). Ferner ist es bekannt, dass die Isolate des gewöhnlich die Braunfäule verursachenden Pathogens *Fusarium graminearum* die Pflanzen asymptomatisch kolonisieren und auch aus gesunden Gräsern isoliert werden können (GOSWAMI & KISTLER, 2004). Im Unterschied zu den von DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* (1995) gelieferten Informationen wurden in der vorliegenden Arbeit z.B. *Microdochium bolleyi* und *Acremonium strictum* als Endophyten charakterisiert (s. 3.1.2).

Viele der isolierten Pilze sind wirtsunspezifisch und können generell, wie z.B. *Gaeumannomyces graminis*, Gräser infizieren (DOMSCH, 1980). Bestimmte *Fusarium*-Spezies, wie z.B. *F. culmorum*, besitzen ein breites Wirtsspektrum. Acremonien (z.B. *Ac. strictum*) sind häufige Endophyten und auch ubiquitär im Boden vorhanden, sodass ein zufälliges Vorkommen in *A. arenaria* in Betracht gezogen werden muss. Darüber hinaus kann die Speziesdiversität innerhalb der Wirtspflanze stark variieren, sodass selbst zwischen zwei Pflanzen gleicher Art starke Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft auftreten können (RODRIGUES *et al.* 2004). Ferner wachsen viele der als Endophyten erscheinenden Pilze gewöhnlich auch auf anderen Substraten und werden daher als zufällige Opportunisten bezeichnet (SCHULZ & BOYLE, 2005).

4.1.2 Wachstum der Pilze im pflanzlichen Gewebe

In den Experimenten zu den Wachstumsmodi von den Pilzisolaten in den Strandhaferpflanzen (s. 2.5.1) wurden in den mikroskopischen Präparaten des pflanzlichen Gewebes keine Pilzhyphen nachgewiesen (s. 3.1.3). Die Resultate der Reinfektionsversuche (s. 2.2.2) deuten darauf hin, dass die Besiedlung von axenischen *A. arenaria* - Keimlingen zu einer Reisolierung der eingesetzten Pilzisolate aus den ausgelegten Pflanzenstücken führt, was das Vorhandensein der Mikroorganismen *in*

planta belegt (vgl. 3.1.2). Wie es jedoch aus den in der Tabelle 3.2 dargestellten Ergebnissen hervorgeht, waren die kolonisierenden Pilze nicht in allen untersuchten Pflanzensegmenten zu finden. Ursächlich dafür kann das lokale Wachstum der Pilze in der Pflanze bzw. die geringe Hyphendichte sein. Ferner wurden bei der Durchführung des Versuches nicht alle zur Verfügung stehende Segmente verwendet. Die Auswahl der auszulegenden Pflanzenstücke erfolgte nach einem Zufallsprinzip, was zu einer zusätzlichen Selektion führte. Darüber hinaus müssen bei der Auswertung der mikroskopischen Präparate die unspezifischen Eigenschaften der angewendeten Farbstoffe (Anilin-Lactoglycerin-Färbelösung, die gleichermaßen Cellulose und Chitin anfärbt oder die für die Proteinanfärbung zuständige Thionin-Lösung) in Betracht gezogen werden (s. 2.5.1). Diese Farbstoffe lassen eine Differenzierung zwischen Pflanze und Pilz aufgrund der Farbtintensitäten zu. Ein selektives Anfärben von den pilzlichen Strukturen ist jedoch unmöglich.

Das Hyphenwachstum im pflanzlichen Gewebe wurde in der vorliegenden Arbeit in den Experimenten mit den abgestorbenen Pflanzensegmenten dokumentiert (s. 2.5.2), bei denen es zu einem massiven Befall durch die Pilze kam (s. 3.1.3 und Abb. 3.2). Es wird vermutet, dass bei der Besiedlung von nicht mehr intakten Pflanzen keine Aktivierung von den pflanzlichen Abwehrprozessen, wie z.B. hypersensitive Antwort, Produktion von Phytoalexinen, Synthese phenolhaltiger Substanzen (z.B. phenolische Glukoside oder Glucoseester) (ISAAC, 1992) stattfand. Als Folge kam es zu einem starken Bewuchs der Pflanzensegmente, der sich durch ein inter- und intrazelluläres Wachstum der Pilze im pflanzlichen Gewebe manifestierte (vgl. Abb. 3.2). Aus diesem Grund konnte aus dem vorliegenden Ergebnis nicht auf die Wachstumsmodi der Pilzisolat *in planta* geschlossen werden.

4.1.3 Die Identifizierung von Pilzspezies mittels *ITS*- und *28S-rRNA*-Region

Bei den vier ausgewählten Pilzisolaten (s. 3.1.2) wurde die Artbestimmung mittels einer morphologischen und einer molekularbiologischen Untersuchung durchgeführt. Die letzte basierte dabei auf der Untersuchung der *ITS*- und *28S-rRNA*-Regionen (vgl. 2.8.1 und 3.9.1).

Der ribosomale rDNA - Genkomplex wird oft zur Identifizierung von Mikroorganismen herangezogen. Bei den Eukaryoten besteht er aus Genen, die für die ribosomale RNA (rRNA) kodieren (18S, 5.8S und 28S) und sich durch eine langsame Mutationsrate auszeichnen. Die 18S-rDNA ist dabei am höchstens konserviert. Die nichtkodierenden variablen Sequenzen innerhalb des Komplexes werden durch den internen

transkribierenden Spacer (ITS) repräsentiert, der sich aus ITS1 und ITS2 zusammensetzt (IWEN *et al.* 2002). Die Sequenzvariation innerhalb von 28S-rDNA (große ribosomale Einheit, LSU) ermöglicht oft eine Gattungsbestimmung (HOPPLE & VILGALYS 1999; ZUCCARO *et al.* 2003; MITCHELL & ZUCCARO, 2006). Die noch höhere Variabilität in der ITS-5.8S-rDNA-Region erlaubt eine Unterscheidung von Arten und sogar von Stämmen (ZUCCARO, 2004; MITCHELL & ZUCCARO, 2006) (s. 1.7).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Art der vier ausgewählten Pilzisolat u.a. durch die Sequenzanalyse der 28S-rRNA und ITS- Region ermittelt (s. 2.8.1 und 3.9.1).

Nach der Analyse der Sequenzen wurde das Pilzisolat TUB6911 mit einer Homologie von jeweils 99 % zu den untersuchten 28S-rRNA- und ITS-Regionen als *Acremonium strictum* identifiziert (vgl. 3.9.1). Für das Pilzisolat TUB6927 wurde eine Homologie von jeweils 99 % (identifiziert als *Fusarium culmorum*), für TUB6930 von je 96 und 97 % (*Microdochium bolleyi*) und für TUB6935 von je 99 und 95 % (*Gaeumannomyces graminis*) festgestellt. Wie unter 1.6 erwähnt, wurden die beiden Regionen gewählt, da sie in Verbindung eine Identifizierung von Gattungen, Arten und Stämmen der untersuchten Pilze erlauben. Eine morphologische Identifizierung alleine, die auf einer Betrachtung von Pilzkulturen, Hyphen oder Sporen beruht, liefert aufgrund einer öfters vorkommenden Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Spezies, eine ungenügende Information über ihre Systematik. In den meisten Fällen lässt sie eine Bestimmung der Gattung zu, in seltenen Fällen ist eine Artfeststellung möglich. In Verbindung mit einer molekularbiologischen Analyse, die auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ist dagegen eine mit hoher Homologie einhergehende Zuordnung zu den in den Datenbanken existierenden Angaben möglich.

Die zur Identifizierung herangezogenen Primer wurden vorwiegend für Umweltstudien entwickelt, in denen die Diversität unter den nicht kultivierbaren Pilzen untersucht werden sollte (KOWALCHUK *et al.* 1997; ZUCCARO *et al.* 2003). ZUCCARO *et al.* (2003) zeigten in den Studien mit der Braunalge *Fucus serratus* und mit ihr assoziierten Pilzen, dass die Pilzdiversität oft die Anzahl der möglichen, mit den Primern amplifizierbaren Spezies, übersteigt. Innerhalb des ribosomalen Genclusters bietet die ITS-Region die höchste Sequenz- und Größenvariation (MITCHELL & ZUCCARO, 2006). In Verbindung mit der 28S-rRNA wurden in der vorliegenden Arbeit die Arten der untersuchten, aus *A. arenaria* isolierten Pilze, mit einer hohen Homologierate identifiziert. Die Zuordnung der Sequenzen erfolgte mittels der GenBank von NCBI und der zugehörigen Suchmaschine BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>; ALTSCHUL *et al.* 1997).

4.1.4 Beschreibung der mittels *ITS*- und *28S-rRNA*-Region identifizierten Pilzisolat

Acremonium strictum

Das in der vorgelegten Arbeit bei den Untersuchungen eingesetzte Pilzisolat *Ac. strictum* ist ein ubiquitärer Vertreter bodenbürtiger Pilze. Nach der Durchführung der Reinfektionsversuche mit dem Strandhafer (s. 2.2.2) wurde der aus *A. arenaria* isolierter Stamm als ein Endophyt eingestuft. In der Natur ist dieser Pilz oft auf Blättern von Gefäßpflanzen, im Boden, Heu und auf anderen Pilzen zu finden. Er kommt in der Rhizosphäre von *Ammophila arenaria*, *Cicer arietinum* oder *Musa* vor (DOMSCH, 1980; DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* 1995). In bestimmten Projekten, wie z.B. an der Universität Hannover (Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz) werden Wechselwirkungen zwischen *biocontrol*-Agenzien und wurzelbesiedelnden Endophyten (hier u.a. mit *Ac. strictum*) sowie Untersuchungen zur induzierten Resistenz bzw. Toleranz durch Endophyten gegenüber bodenbürtigen Krankheitserregern durchgeführt.

Systematik von *Ac. strictum* W. Gams 1971

Reich: Pilze
Stamm: Ascomycota
Klasse: Ascomycetes
Ordnung: Hypocreales
Gattung: Acremonium

Art: *Acremonium strictum*

Microdochium bolleyi

M. bolleyi wird oft in landwirtschaftlich genutzten Böden vorgefunden. Nach DOMSCH (1980) kommt der Pilz in den USA auf den Wurzeln von 121 grasartigen Spezies vor. Das Wirtsspektrum des Pilzes ist somit sehr heterogen. *M. bolleyi* ist sowohl auf gesunden als auch auf erkrankten Weizenwurzeln präsent sowie in der Rhizosphäre von Grasmonokulturen, Kartoffeln, Zuckerrübe und Weizen vorhanden. Prinzipiell ist der Pilz nicht pathogen, kann jedoch in seltenen Fällen Erkrankungen von Getreidekeimlingen und von Luzerne auslösen (DOMSCH, 1980). Bei den von DE ROOIJ-VAN DER GOES *et al.* (1995) dargestellten Resultaten wird der Pilz als ein Pathogen bezeichnet. In den durchgeführten Reinfektionsversuchen mit *A. arenaria* (s. 2.2.2) erwies sich der aus Strandhafer isolierte Pilz als ein Endophyt. Ferner wurde bei den von *M. bolleyi*

besiedelten *A. arenaria*- Pflanzen eine Zunahme der Biomasse, im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, festgestellt (vgl. 3.2.2 und Abb. 3.4).

Systematik von *M. bolleyi* (R. Sprague) de Hoog & Herm.-Nijh. 1977

Reich: Pilze
Stamm: Ascomycota
Klasse: Ascomycetes
Familie: Xylariales
Ordnung: Hyponectriaceae
Gattung: Microdochium

Art: *Microdochium bolleyi*

Gaeumannomyces graminis

Der bei den in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Versuchen eingesetzte Pilz *G. graminis*, auch als „take-all fungus“ genannt, ist einer der wichtigsten Getreidepathogenen in der Landwirtschaft, der die sog. Schwarzbeinigkeit verursacht (FREEMAN & WARD, 2004). Der bodenbürtige Parasit befällt vorwiegend Weizen, aber auch Gerste, Mais, Roggen, Hafer und zahlreiche Gräserarten. Von *G. graminis* gibt es drei verschiedene Varietäten, die sich auf bestimmte Wirtspflanzen spezialisiert haben: *var. tritici*, *var. avenae* und *var. graminis*. Unter deutschen Anbaubedingungen kommt die Varietät *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Ggt) am häufigsten vor und hat auch die größte wirtschaftliche Bedeutung (DOMSCH, 1980). Die starke Pathogenität, die von diesem Pilz ausgeht, wurde ebenfalls in den Reinfektionsversuchen mit *A. arenaria* bestätigt (s. 2.2.2). Die infizierten Pflanzen wuchsen nur gering und wiesen ausgeprägte Krankheitssymptome auf.

Systematik von *G. graminis* (Sacc.) Arx & D.L. Olivier 1952

Reich: Pilze
Stamm: Ascomycota
Klasse: Ascomycetes
Familie: Magnaporthaceae
Gattung: Gaeumannomyces

Art: *Gaeumannomyces graminis*

Fusarium culmorum

F. culmorum ist ein Pflanzenpathogen mit einem weiten Wirtsspektrum. Befallen werden Getreidesorten (z.B. Weizen) sowie andere Kulturpflanzen wie z.B. Kartoffeln, Raps oder Zuckerrüben. Der Pilz kommt besonders oft in den grasbewachsenen sowie landwirtschaftlich benutzten Gebieten vor. Auch in anderen Habitaten wie z.B. Dünen, Salzwiesen, Torf oder Wasser, ist dieser Pilz zu finden. *F. culmorum* wurde oftmals in der Rhizosphäre von Bohne, *Lolium perenne*, Weizen und verschiedenen Gräsern vorgefunden. Der Pilz wurde regelmäßig aus den Samen von z.B. Hafer, Gerste, Weizen und von anderen Getreidesorten isoliert und ist ebenso auf lebendigen und abgestorbenen Wurzeln von Gerste, Wurzeln und Halmen von Roggen, Weizen sowie auf Klee zu finden (DOMSCH, 1980). Die Pathogenität des aus *A. arenaria* isolierten *F. culmorum*-Stammes wurde auch in den mit Strandhafer durchgeführten Reinfektionsversuchen bestätigt (s. 2.2.2). Die befallenen Pflanzen zeichnete eine systemische Pilzinfektion aus, die ihre Produktivität und das Wachstum beeinträchtigte.

Systematik von *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. 1895

Reich:	Pilze
Stamm:	Ascomycota
Klasse:	Ascomycetes
Ordnung:	Hypocreales
Familie:	Nectriaceae
Gattung:	Fusarium

Art: *Fusarium culmorum*

4.2 Stickstoffmetabolismus von *A. arenaria*

Stickstoff ist für die Biosynthese organischer Verbindungen essentiell und nimmt daher im pflanzlichen Stoffwechsel eine zentrale Bedeutung ein. Er wird in der Regel als Nitrat (NO_3^-) aus dem Medium aufgenommen, seltener als Ammonium (NH_4^+), und in die organischen Verbindungen (Aminosäuren, Proteine, Nucleinsäuren, Coenzyme) in einer reduzierten Form eingebaut (STRASSBURGER, 2002; SUZUKI & KNAFF, 2005). Die Assimilation von Ammonium erfolgt dabei durch den Glutamin-Synthase- / Glutamat-Synthase-Zyklus (MIFLIN & LEA, 1977; PAJUELO *et al.* 1997; s. auch 1.4.2 und 2.7.3). Die wichtige Funktion von Aminosäuren in der Pflanzenresistenz gegen biotischen Stress wurde mehrmals beschrieben (RAGGI, 1994; BOHNERT & SHEVELEVA, 1998; RHODES *et al.* 1999; MUNNS, 2002; HASEGAWA *et al.* 2000; YOKOI *et al.* 2002). Die Untersuchungen fokussierten dabei vor allem die Synthese von kompatiblen Soluten, zu denen u.a. die

Aminosäuren (z.B. Prolin) und deren Derivate (quartäre ammoniumhaltige Substanzen, wie Glycinbetain, Prolinbetain, β -Alaninbetain und Cholin-O-Sulfat, tertiäre sulfoniumhaltige Substanzen, wie 3-Dimethylsulfoniopropionat sowie DSMP, Polyamine und Glutathion) gehören (RHODES *et al.* 1999) (s. 1.1.2).

Als Folge einer Besiedlung mit Pilzen kann der Aminosäurespiegel der Pflanze ebenso Veränderungen erfahren (SOLOMON & OLIVER, 2001; WAGNER, 2002). Dies kann durch die Fähigkeit der Pilze zur Verwertung von unterschiedlichen N-Quellen (Ammonium, L-Glutamat, L-Glutamin, Asparagin oder Prolin) zustande kommen (MARZLUF, 1997).

Eine Zusammenfassung von den wichtigsten Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit für die ausgewählten Parameter des *A. arenaria*- Metabolismus bestimmt wurden, ist in der Tabelle 4.1 wiedergegeben.

Versuch	Untersuchter Parameter									
	Biomasse	Aminosäuren		Zucker und Zuckeralkohole				Fd- GOGAT	P5CS	AaPDH
		L-Pro	L-Glu	Sacch	Gluco	Fructo	Mannit			
125 mM 1)	-	+	-	+	u	u	nn	u	u	
250 mM	-	+	-	u	u	u	nn	u	+	
375 mM	-	+	-	u	u	u	nn	u	+	
Ac. strictum M&S 2)	u	u	-	u	u	u	-	u	u	
Ac. strictum 125 mM	u	u	-	u	u	u	-	-	u	
Ac. strictum 250 mM	u	+	-	nn	u	u	-	u	+	
Ac. strictum 375 mM	-	+	-	nn	u	u	-	+	u	
M. bolleyi M&S 2)	+	u	-	u	u	u	nn	-	u	
M. bolleyi 125 mM	u	u	-	u	u	u	nn	-	+	
M. bolleyi 250 mM	u	+	-	u	u	u	nn	u	+	
M. bolleyi 375 mM	-	+	-	u	u	u	-	u	+	
F. culmorum M&S 2)	-	u	-	u	u	u	nn	u	u	
F. culmorum 125 mM	-	+	-	u	u	u	nn	u	u	
F. culmorum 250 mM	-	+	-	nn	u	u	nn	u	u	
F. culmorum 375 mM	-	-	-	nn	u	nn	nn	+	u	
G. graminis M&S 2)	-	+	-	nn	u	u	nn	u	u	
G. graminis 125 mM	-	u	-	nn	u	u	-	u	u	
G. graminis 250 mM	-	+	-	nn	nn	nn	nn	u	u	
G. graminis 375 mM	-	+	-	nn	nn	nn	-	u	u	
salzgestresst 3)										-
rehydriert										+

Tab. 4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse, die für die ausgewählten Parameter des *A. arenaria*- Metabolismus ermittelt wurden. Die Informationen über eine Zunahme (+), Abnahme (-), keine Veränderung (u) oder einen nicht nachweisbaren Messwert (nn) des untersuchten Parameters wurden in Bezug auf die jeweiligen Kontrollversuche angegeben.

1) – Salzversuche ohne Pilzbesiedlung (vgl. 2.3.1 A); **2)** – Versuche mit salzgestressten und / oder von den Endophyten (grau markiert) bzw. von den Pathogenen inokulierten Strandhaferpflanzen (keine Markierung) (vgl. 2.3.1 B und C); **3)** – Kurzzeitversuche zur Expressionsregulation der Prolindehydrogenase aus *A. arenaria* (**AaPDH**) bei den **salzgestressten** bzw. **rehydrierten** Pflanzen (blau markiert) (vgl. 2.8.3). **M&S** – Murashige und Skoog- Medium; **L-Pro** – L-Prolingehalt; **L-Glu** – L-Glutaminsäuregehalt (vgl. 2.7.1); **Sacch** – D-Saccharosegehalt; **Gluco** – D-Glucosegehalt; **Fructo** – D-Fructosegehalt; **Mannit** – D-Mannitgehalt (s. 2.7.2); **Fd-GOGAT** – spezifische Aktivität der Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (s. 2.7.3); **P5CS** – spezifische Aktivität der Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (vgl. 2.7.4).

4.2.1 Aminosäurenpool von *A. arenaria*

4.2.1.1 Aminosäurenpool nach Salzstresseinwirkung

Mit steigenden NaCl-Konzentrationen traten bei den untersuchten *A. arenaria*-Pflanzen (ohne Pilzbesiedlung) signifikante Verringerungen der L-Glutamatgehalte und eine geringe, nicht statistisch unterschiedliche Reduktion von L-Glutamin auf (s. 3.4.1). Auch bei salzgestressten transgenen Tabakpflanzen stand die Prolinakkumulation mit dem Glutamatverbrauch in Verbindung (KISHOR *et al.* 1995). RHODES *et al.* (1999) schlugen vor, dass Glutamat eine direkte Vorstufe in der durch den osmotischen Stress induzierten Prolinbiosynthese darstellt. Die mit der Prolinzunahme korrelierende Abnahme von L-Glutamat (vgl. Abb. 3.9) bei *A. arenaria* bestätigt diese These.

Die Zunahme der L-Prolinkonzentration, verursacht durch den steigenden NaCl-Gehalt im M&S-Medium (vgl. 3.4.1), ist auf die Akkumulation dieser Aminosäure im Cytoplasma der Zellen zurückzuführen und bestätigt somit die bedeutungsvolle Funktion von Prolin im Schutz der Pflanze gegen den Salzstress. Die Antwort der Pflanzen auf den Wasser-, Salinität- oder Kältestress zeigt sich oft in der Synthese von dieser Aminosäure (SAMARAS *et al.* 1995). RAGGI (1994) stellte bei *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) nach neun Tagen Wasserstress, eine vierfache Zunahme des Prolingehaltes fest. Bei den über eine Woche unter Wasserstresseinwirkung wachsenden *Gossypium hirsutum*-Pflanzen (Baumwolle) zeigte sich, im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, ein 50facher Anstieg der Prolinkonzentration (SHOWLER, 2002). In den 24 h dauernden Versuchen mit 200 mM NaCl bildeten die Tomatenpflanzen zweimal mehr Prolin, als ohne den Salzstress (BERTELI *et al.* 1995). Auch DI MARTINO *et al.* (2003) berichten über eine 35fache Steigerung von Prolin und eine gleichzeitige 6fache Verringerung des Glutamatgehaltes, bei dem über 27 Tage in 0,17 M NaCl kultivierten Spinat. Die 5fache Zunahme des Prolingehaltes bei dem über vier Wochen mit 375 mM NaCl gestressten Strandhafer (vgl. 3.4.1) bestätigt somit die in der Literatur zitierten Resultate. Die Funktion von Prolin besteht jedoch nicht nur darin, den osmotischen Druck in der Zelle auszugleichen. Es kann auch als Fänger von freien Radikalen oder Kohlenstoff- bzw. Stickstoffspeicher fungieren (BOHNERT & SHEVELEVA, 1998; HASEGAWA *et al.* 2000) und Membranen stabilisieren, indem es mit den Phospholipiden interagiert (SAMARAS *et al.* 1995). Weitere wichtige Funktionen von Prolin unter Stresseinwirkung sind unter 1.2.3 dargestellt.

Die Analyse der untersuchten Aminosäuren bei den mit Salzstress und ohne Pilzinokulation kultivierten *A. arenaria*-Pflanzen ergab, außer bei Prolin, Glutamat,

Glutamin und Asparagin, kaum auf den Salzstress zurückzuführende Veränderungen bei Serin, Alanin, Valin und Asparaginsäure.

4.2.1.2 Aminosäurenpool nach Pilzbesiedlung

Die Pflanzen kolonisierenden Pilze beziehen ihren ganzen Stickstoffbedarf von ihren Wirten (SOLOMON *et al.* 2003). Die meisten Vertreter können Stickstoff in anorganischer (z.B. NH_4^+ , NO_3^-) oder organischer (Proteine, Aminosäuren) Form verwerten. Einige der N-Quellen gelangen durch die Diffusion in die Hyphen. Proteine werden durch die Proteaseaktivität in Aminosäuren gespalten. Diese können dann durch spezifische Carriersysteme in die Zellen aufgenommen werden (ISAAC, 1992). Molekulare Studien mit dem *Vicia faba* kolonisierenden Pilz *Uromyces fabae* haben ergeben, dass die Aufnahme von Aminosäuren durch den in den Haustorien exprimierten Transporter *AAT2p* stattfindet (BIEMELT & SONNENWALD, 2006).

SOLOMON & OLIVER (2001) untersuchten den apoplastischen Aminosäuregehalt von Tomate während der kompatiblen und inkompatiblen Infektion mit *Cladosporium fulvum*. Eine kompatible Infektion erhöhte 4 bis 5fach die Konzentration von den meisten Aminosäuren. Es wird spekuliert, dass der Pilz den pflanzlichen Metabolismus zu seinen Gunsten manipuliert, was u.a. eine Steigerung der Apoplastenaminosäuren zur Folge hat (SOLOMON *et al.* 2003). Als Ursache dafür nennen SOLOMON & OLIVER (2001) einige Gründe. Hier werden u.a. die Pilzautolyse selbst, erhöhte Nitrataassimilation und erhöhte Proteaseaktivität diskutiert, die den Stickstoff für den Pilzmetabolismus liefern. Dabei werden von dem Pilz als mögliche N-Quellen Nitrat, Ammonium, Glutamat, Glutamin, Aspartat, Asparagin und auch gamma-Aminobuttersäure (GABA) verwertet. Widersprüchliche Angaben finden sich dagegen bei VAN DEN ACKERVEKEN *et al.* (1994), wo von einer Reduktion des Aminosäurepools während einer Infektion berichtet wird. Dies ist, den Autoren nach, auf den Aminosäureverbrauch durch den Pilz zurückzuführen.

Bei den mit den endophytischen bzw. pathogenen Pilzen inokulierten und mit NaCl gestressten *A. arenaria*-Pflanzen, zeigten sich in allen untersuchten Ansätzen, im Vergleich zur Kontrolle, signifikante Abnahmen von L-Glutamat (s. Abb. 3.9). Die adäquate und ebenfalls signifikante Zunahme der Prolingehalte in den gleichen Proben spricht dabei für eine stressbedingte und L-Glutamat-abhängige Synthese von Prolin. Die um ca. 25 % erhöhten Prolinkonzentrationen der inokulierten und gleichzeitig salzgestressten, im Vergleich zu den ohne Pilze kultivierten Pflanzen (vgl. Abb. 3.9), deuten einerseits auf eine Belastung durch Pilz und durch NaCl hin. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Pilze selbst zu der vorgefundenen Prolinanreicherung beigetragen haben. Gegen die zweite Vermutung spricht jedoch die Tatsache, dass bei den untersuchten Pilzisolaten keine Aktivität der in die Prolinbiosynthese involvierten

Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase festgestellt wurde (s. 3.8). Bezugnehmend auf die Ergebnisse der Biomassebildung (s. 3.2) bei den von den endophytischen bzw. pathogenen Pilzen besiedelten und salzgestressten *A. arenaria*-Pflanzen, ist davon auszugehen, dass die erhöhte Salztoleranz der endophytisch besiedelten Pflanzen auf andere Mechanismen, als auf die Prolinbildung, zurückzuführen ist.

DI MARTINO *et al.* (2003) diskutieren eine signifikante Zunahme von Leucin, Isoleucin, Valin, Lysin und Tryptophan als eine Folge des Proteinabbaus. In den durchgeführten Tests (s. 3.4.3) wurden bei den mit den Pilzisolaten inokulierten und in 125 mM NaCl kultivierten Strandhaferpflanzen, teilweise signifikant erhöhte L-Valingehalte ermittelt. Eine steile, mit der Steigerung des Salzgehaltes korrelierende Abnahme der Proteingehalte (s. Anhang E. 1) wurde dagegen nur bei den von *Ac. strictum* und *F. culmorum* besiedelten Pflanzen ermittelt und steht somit nicht mit den erhöhten Valinkonzentrationen in Zusammenhang. Nach WAGNER (2002) gehört Valin zu denjenigen Stressamino-säuren, deren Konzentration u.a. bei einem Pilzbefall zunimmt. In den durchgeführten Versuchen hatte die Besiedlung von *A. arenaria* mit den Pilzen keine Steigerung des Valingehaltes zur Folge. Nur die gleichzeitige Kultivierung in 125 mM NaCl, und bei den mit *G. graminis* inokulierten Pflanzen auch die Behandlung mit 250 mM NaCl, erhöhte die L-Valinkonzentration.

Die Steigerung der Salinität im M&S-Medium hatte die Verringerung der Serinkonzentration zur Folge, die jedoch nur bei den mit *M. bolleyi*, *F. culmorum* und *G. graminis* inokulierten *A. arenaria*-Pflanzen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle aufwies (vgl. Abb. 3.10). Serin kann in die Synthese von Glycinbetain involviert sein (LEA & IRELAND, 1999), das bei einigen Pflanzen (u.a. bei Poaceae) als Osmoprotektant fungiert (WERETILNYK & HANSON, 1990; MCNEIL *et al.* 1999; SAKAMOTO & MURATA, 2002). Die Bildung von Glycinbetain wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, jedoch schließt die Abnahme des Seringehaltes nicht aus, dass *A. arenaria* Glycinebetain als kompatibles Solut verwendet.

Die Steigerung der Salinität im Düngungsmedium sowie die Besiedlung der Pflanzen mit den Pilzisolaten resultierten in verringerten Aspartatmengen. Eine proteolytische Pilzaktivität kann zu infektionsbedingten erhöhten Ammoniumkonzentrationen führen (WAGNER, 2002). Als eine mögliche Ammoniumquelle werden auch der befall- (WAGNER, 2002) und salzstressbedingte (SINGH & CHATRATH, 2001) RubisCO-Abbau diskutiert. Die von einer Asparagin-Synthetase katalysierte Umwandlung von Aspartat zu Asparagin, beseitigt die für die Pflanze toxischen NH_4^+ -Ionen (SADLER & SCOTT, 1974). Die mit der

Aspartatabnahme übereinstimmende Erhöhung des Asparagingehaltes wurde bei den salzgestressten (250 mM NaCl) und ohne die Pilzbesiedlung sowie bei den mit *Ac. strictum* inokulierten und in 375 mM NaCl kultivierten Pflanzen festgestellt (vgl. Abb.3.11). MIFLIN & LEA (1977) erwähnen Asparagin in Hinblick auf seine stickstoffspeichernde und Transportfunktion. Asparagin wird vorwiegend unter Kohlenstoffmangel gebildet (MIFLIN & LEA, 1977). Seine Zunahme bei der Anwesenheit von 250 mM NaCl im Düngungsmedium könnte als ein Versuch der Pflanze angesehen werden, bei der salzstressbedingten Verringerung der Assimilate sich z.B. Asparagin, als Speicherquelle für N und C, zu bedienen. Eine Reduktion des L-Asparagingehaltes, wie das bei den mit *F. culmorum* infizierten Pflanzen der Fall war (vgl. Abb. 3.11), spricht für eine Verwertung durch den besiedelnden Pilz. Unklar bleibt die starke Zunahme von L-Asparagin bei dem mit *Ac. strictum* und in 375 mM NaCl kultivierten Strandhafer. Es wird vermutet, dass sowohl die Versuchslänge (vier Wochen) als auch die im genannten Fall eingesetzte hohe Salzkonzentration von 375 mM einen starken Stress auf die Pflanzen und somit einen negativen Einfluss auf die Physiologie von *A. arenaria* hatte.

4.2.2 Ferredoxin abhängige Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT) von *A. arenaria*

4.2.2.1 Fd-GOGAT nach Salzstresseinwirkung

Der Beweis dafür, dass während der Salzstressbehandlung nicht das ganze Glutamat in die Prolinbiosynthese mit einfließt, ist aus den entgegengesetzten Verläufen der in der Abbildung 3.9 dargestellten L-Glutamat- und L-Prolinkurven zu entnehmen: ein steiler L-Prolinanstieg bei den in 250 mM NaCl kultivierten Pflanzen hatte eine viel geringere Abnahme von L-Glutamat zur Folge. BERTELI *et al.* (1995) stellten bei der Tomate eine mit der Steigerung des NaCl-Gehaltes korrelierende Zunahme der Fd-GOGAT-Aktivität fest. Dies fand in den mit *A. arenaria*-Pflanzen durchgeführten Versuchen (vgl. 2.7.3 und 3.7) keine Bestätigung. Die spezifische Aktivität der Fd-GOGAT wies keine salzstressbedingten Veränderungen bei den ohne Pilzinokulation kultivierten *A. arenaria*-Pflanzen auf. Aufgrund dessen, dass das reduzierte Ferredoxin durch den photosynthetischen Elektronentransport entsteht, ist die in den Chloroplasten lokalisierte Fd-GOGAT vom Licht, aber auch von NO_3^- und NH_4^+ , abhängig (PAJUELO *et al.* 1997; SUZUKI *et al.* 2001; STRASSBURGER, 2002). Die Tatsache, dass Fd-GOGAT unter Salzstressbedingungen keine Abnahme der spezifischen Aktivität zeigte sowie die Abhängigkeit des Enzyms von Ferredoxin, scheinen ein Beweis dafür zu sein, dass der Photosyntheseapparat von *A. arenaria* auch bei einer Einwirkung von 375 mM NaCl intakt

blieb. POPOVA *et al.* (2002) untersuchten u.a. die Aktivität von Fd-GOGAT bei dem fakultativen Halophyt *Mesembryanthemum crystallinum*. Sie stellten nach 6 h Inkubation in 400 mM NaCl eine Zunahme der Enzymaktivität und nach weiteren drei Tagen eine Steigerung des Prolingehaltes fest. Die Autoren diskutierten, dass Fd-GOGAT während der ersten Stressstunden in die Prolinsynthese involviert ist. Gleiche Aussagen finden sich bei BERTELI *et al.* (1995) für die Tomate und bei LUTTS *et al.* (1999) für den Reis. Es muss jedoch an dieser Stelle angemerkt werden, dass sich bei den erwähnten Autoren die Untersuchungen auf einen Salzstress konzentrierten, der zwischen Stunden oder 3 bis 4 Tagen dauerte. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden erst nach einer Langzeitbehandlung von vier Wochen abgebrochen (vgl. 2.3.1). VERBRUGGEN *et al.* (1996), KYOSUE *et al.* (1996) sowie PENG *et al.* (1996) haben gezeigt, dass der Prolinabbau unter der Einwirkung von osmotischem Stress inhibiert ist. Dafür sprechen auch die hohen Prolinkonzentrationen, die in den mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen gestressten *A. arenaria*-Pflanzen vorgefunden wurden (s. Abb. 3.9). Es kann angenommen werden, dass die zum Zeitpunkt der Ernte gemessenen Prolingehalte in den ohne Pilzinokulation kultivierten Strandhaferpflanzen auf die indirekte Funktion von u.a. Fd-GOGAT bei der Prolinbiosynthese zurückzuführen sind. Sollte Fd-GOGAT indirekt in die Bildung von Prolin bei *A. arenaria* involviert sein, erklärt die Länge der Versuche, aus welchem Grund nach vier Wochen Salzstress, im Vergleich zur Kontrolle, eine unveränderte Aktivität von diesem Enzym ermittelt wurde.

4.2.2.2 Fd-GOGAT nach Pilzbesiedlung

Die Steigerung des NaCl-Gehaltes im M&S-Medium auf 375 mM bei den von *Ac. strictum* und *F. culmorum* besiedelten Pflanzen hatte, anders als bei den ohne Pilzinokulation kultivierten Pflanzen, eine signifikante Erhöhung der spezifischen Fd-GOGAT-Aktivität zur Folge (vgl. Abb. 3.16). Da in den beiden Fällen auch ein starker Proteinabbau stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt; Rohdaten s. Anhang E. 1), ist zu vermuten, dass Glutamat, das als Substrat für die Fd-GOGAT fungiert, aus der Proteolyse und nicht aus der Synthese oder von den Transaminierungsreaktionen stammte. Eine drastische Reduktion des Prolin-, Glutamin- und Asparagingehaltes bei den mit *F. culmorum* inokulierten und in 375 mM NaCl kultivierten Strandhaferpflanzen, verbunden mit einem bedeutenden Proteinabbau, deutet auf eine starke Stresseinwirkung hin. Die mit der osmotischen Anpassung verbundenen hohen Energiekosten sowie der Nährstoffentzug durch den Pilz, konnten von der Pflanze vermutlich nicht mehr kompensiert werden und resultierten auch in einer geringen Biomasse (vgl. 3.2.1 und 4.5.2). Die über vier Wochen andauernden Versuche bzw. ein starker Stress, der sowohl durch die hohe Salzkonzentration (375 mM) als auch durch die Pilzbesiedlung auf die Pflanzen einwirkte,

könnte für die erhöhte spezifische Aktivität von Fd-GOGAT im gleichen Ansatz zuständig sein.

4.2.3 Prolinmetabolismus von *A. arenaria*

4.2.3.1 Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) nach Salzstresseinwirkung

Die Prolinbiosynthese in nicht gestressten Pflanzen erfolgt aus Ornithin oder aus Glutamat. Im ersten Fall katalysiert eine Ornithin- δ -Aminotransferase (OAT; EC 2.6.1.13) eine Umsetzung von Ornithin und 2-Oxoglutarat zu Glutamat-Semialdehyd (GSA). Die Reaktion findet in den Mitochondrien statt. GSA kann entweder zu Glutamat umgesetzt oder in einer spontanen Reaktion zu Pyrrolin-5-Carboxylat umgewandelt werden. Im letzten Fall katalysiert die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (P5CR; EC 1.5.1.2) die Reaktion von Pyrrolin-5-Carboxylat zu Prolin (HARE & CRESS, 1997). Wird die Pflanze jedoch osmotischem Stress oder N-limitierenden Bedingungen ausgesetzt, wird Prolin ausschließlich aus Glutamat gebildet (DELAUNEY & VERMA, 1993; KISHOR *et al.* 1995; HUA *et al.* 1997; STRIZHOV *et al.* 1997). Eine Schlüsselfunktion hat dabei die Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) (vgl. 1.4.3.1).

HU *et al.* (1992) stellten fest, dass unter Salzstresseinwirkung die Transkription von *P5CS* in *Vigna aconitifolia* signifikant erhöht war und eine Steigerung des Prolingehaltes zur Folge hatte, was auch für transgene *Nicotiana tabacum*-Pflanzen (KISHOR *et al.* 1995; HONG *et al.* 2000), *Arabidopsis thaliana* (SAVOURE *et al.* 1995; YOSHIBA *et al.* 1995; STRIZHOV *et al.* 1997), *Oryza sativa* (IGARASHI *et al.* 1997) oder Tomate (GARCIA-RIOS *et al.* 1997; FUJITA *et al.* 1998) nachgewiesen wurde. Die Autoren gaben dabei an, dass die starke Expression von *P5CS* und die Prolinakkumulierung auf die Einwirkung von Salzstress zurückzuführen sind. Auch bei den in der vorliegenden Arbeit dem Salzstress ausgesetzten *A. arenaria*-Pflanzen ohne Pilzbesiedlung, erhöhte sich die spezifische Aktivität von *P5CS*. Vorwiegend in den über vier Wochen mit 250 und 375 mM NaCl gestressten Pflanzen war die Enzymaktivität, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant erhöht (jeweils um 39 und 63 %; vgl. 3.8). Eine gleichzeitig signifikante Zunahme der Prolinkonzentration in den untersuchten Ansätzen um das fünffache (s. 3.4.1) bestätigt die wichtige Funktion von Prolin bei den salzgestressten Pflanzen und steht somit mit den in der Literatur zitierten Ergebnissen in Einklang.

KISHOR *et al.* (1995) ermittelten bei den mit 250 und 400 mM NaCl gestressten transgenen Tabakpflanzen eine um 10 bis 18 mal höhere Prolinkonzentration im Vergleich zu den

Kontrollen. Auch FUJITA *et al.* (1998) stellten bei den mit 200 mM NaCl gestressten Tomatenpflanzen eine 60 – 80fache Zunahme des Prolingehaltes fest. Diese Versuche beweisen, dass die unter normalen Bedingungen durch die negative Rückkopplung funktionierende Regulation von P5CS unter Salzstresseinwirkung aufgehoben wird, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde (vgl. 3.8 und 3.9.4). Dies wird mit einer Konformationsänderung des P5CS-Proteins in Zusammenhang gebracht (HONG *et al.* 2000).

4.2.3.2 Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) nach Pilzbesiedlung

Die Prolinkonzentration stieg in den mit den Endophyten und mit den Pathogenen Pilzisolaten inokulierten *A. arenaria*- Pflanzen auf. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Prolinkonzentration der kolonisierten und gleichzeitig salzgestressten Pflanzen um ca. 25 % höher lag, als bei dem ohne Pilzbesiedlung inokulierten Strandhafer (s. 3.4.1). Ähnliche Resultate wurden von FABRO *et al.* (2004) präsentiert. Die Autoren stellten fest, dass auch während einer inkompatiblen Interaktion zwischen *A. thaliana* und dem avirulenten *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* – Stamm eine transkriptionelle Aktivierung von P5SC stattfand, die eine Prolinakkumulierung um das 8fache zur Folge hatte. Die Autoren zeigten, dass die Prolinakkumulation vorwiegend in und um die Zellen stattfand, die an der hypersensitiven Antwort beteiligt waren. Dabei wird Prolin eine wichtige Funktion beim Abfangen von freien Radikalen zugesprochen. Darüber hinaus wird die Funktion von Pyrrolin-5-Carboxylat bei der Aktivierung der Apoptose diskutiert. Die Prolinkonzentration in den Pflanzen, die von dem virulenten Stamm infiziert wurden, erfuhr dagegen keine Veränderungen.

In Anlehnung an die von FABRO *et al.* (2004) dargestellten Resultate wird vermutet, dass die Besiedlung von salzgestressten *A. arenaria*- Pflanzen mit den Pilzisolaten, auch im Fall von den Endophyten, eine weitere Belastung für die Pflanzen darstellte. Diese These ist auf den erhöhten Prolingehalt in den besiedelten und gleichzeitig salzgestressten Strandhaferpflanzen zurückzuführen. Ob es sich bei den von den endophytischen bzw. pathogenen Pilzen kolonisierten *A. arenaria*- Pflanzen um eine inkompatible bzw. kompatible Interaktion handelt, kann jedoch nicht bestätigt werden.

Es ist bekannt, dass die Kolonisierung mit den Endophyten die pflanzliche Abwehr induzieren kann (z.B. hypersensitive Antwort; s. 1.2). Es kommt dabei zur Bildung und Anreicherung von z.B. antimikrobiellen Substanzen (Phytoalexinen, wie z.B. Pisatin oder Rishitin) (STRASBURGER, 2002), von phenolhaltigen Substanzen (SCHULZ *et al.* 1999) oder zum *oxidativen burst* (PETERS *et al.* 1998) (vgl. 1.2). Soll auch Prolin eine protektive Funktion während der Kolonisierung haben, wäre dies eine Erklärung für die erhöhten

Mengen dieser Aminosäure in den besiedelten Pflanzen. Unerklärt dagegen bleiben die in den kolonisierten und gleichzeitig in den salzgestressten *A. arenaria*-Pflanzen ermittelten geringen Werte der spezifischen Aktivität von P5CS, im Vergleich zu den ohne Pilzinokulation kultivierten Pflanzen (vgl. Abb. 3.17). Prolin wird einige Stunden nach der Stressapplikation gebildet. Sollen seine hohen Konzentrationen über längere Zeit in den Zellen unverändert bleiben, kann vermutet werden, dass sich nach vier Wochen Versuchsdauer die Enzymaktivität von P5CS verminderte. Die Bildung von Prolin kann auch aus Ornithin folgen. Da jedoch die OAT und P5CS reziprok reguliert werden (VERMA, 1999) und da die P5CS-Aktivität in den untersuchten Ansätzen nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung von L-Prolin in den salzgestressten und von Pilzen besiedelten Pflanzen aus Glutamat erfolgte. Anzunehmen ist ebenfalls, dass die besiedelnden Pilze einen Einfluss auf die Aktivität der pflanzlichen P5CS hatten und somit zur Steigerung des Prolinspiegels beigetragen haben. Diese These würde erklären, warum in den salzgestressten und ohne Pilzinokulation kultivierten Strandhaferpflanzen keine Abnahme der spezifischen Aktivität von P5CS und auch im Vergleich zu den inokulierten *A. arenaria*-Pflanzen höhere L-Prolingehalte festgestellt wurden (vgl. Abb. 3.17 A).

YOSHIBA *et al.* (1995) untersuchten die cDNA von P5CS und P5CR aus *A. thaliana* unter Salzstresseinwirkung (250 mM NaCl für 10 h). Die Autoren fanden keine signifikante Induktion von P5CR bei den gestressten Pflanzen. Sie schlugen daher vor, dass im Gegensatz zu der P5CR die Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase eine Schlüsselfunktion bei der Prolinbiosynthese hat.

Die L-Prolinakkumulation ist unter Stressbedingungen nicht nur auf die erhöhte Prolinbiosynthese sondern auf die Inaktivierung des Prolinabbaus zurückzuführen (NAKASHIMA *et al.* (1998). KIYOSUE *et al.* (1996), PENG *et al.* (1996) und VERBRUGGEN *et al.* (1996) bestätigten in ihren Versuchen eine auf den osmotischen Stress zurückgehende Runterregulation der Prolindehydrogenase bei *A. thaliana*. Sie fanden eine mit der Stressentfernung einhergehende Abnahme der P5CS-Transkripte, die von einer starken PDH-Expression und einer Reduktion des Prolingehaltes begleitet wurde (vgl. 1.4.3.1). NAKASHIMA *et al.* (1998) fanden 10 h nach der Stressapplikation keine PDH-Transkripte in den untersuchten *Arabidopsis*-Ansätzen. Wurden die Pflanzen rehydriert, wurden innerhalb von 2 h große PDH-Transkriptmengen nachgewiesen. Bei den von KIYOSUE *et al.* (1996) durchgeführten Versuchen waren 10 h nach der Stressentfernung die PDH-mRNAs, im Vergleich zur Kontrolle, um das 37fache erhöht und noch über 48 h nachweisbar. Prolin wurde dagegen binnen 38 h abgebaut (YOSHIBA *et al.* 1997).

4.2.3.3 Regulation der Genexpression von Prolindehydrogenase (*AaPDH*) bei *A. arenaria*

Die *A. arenaria*- Pflanzen wurden in den Kurzzeitversuchen (s. 2.3.2) über 48 h mit 250 mM NaCl gestresst und anschließend über 6 h rehydriert. Es wurde dabei bestätigt, dass der Salzstress die Expression von *AaPDH* runterreguliert, was höchstwahrscheinlich in einer Prolinakkumulierung resultiert (für die Kurzzeitversuche nicht ermittelt). Eine Rehydrierung dagegen hatte eine Induktion der *AaPDH*-Expression zur Folge (vgl. 3.9.4). Eine auf den Salzstress zurückgehende Steigerung der P5CS-Aktivität (3.7) und Prolinakkumulierung (vgl. 3.4.1) wurde in den Langzeitversuchen ermittelt.

Die Enzyme P5CS und PDH unterliegen unter Stressbedingungen einer reziproken Kontrolle und besitzen somit eine regulatorische Funktion bei der Prolinbiosynthese und -Degradierung. Sie werden als geschwindigkeitsbestimmende Faktoren („*rate-limiting*“) bezeichnet (YOSHIBA *et al.* 1997; STINES *et al.* 1999; HARE *et al.* 1999; MAGGIO *et al.*, 2002; RAYMOND & SMIRNOFF, 2002) (s. 1.4.3). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen somit auch für *A. arenaria* eine vom osmotischen Stress abhängige Regulation der Prolindehydrogenase. Ferner kann davon ausgegangen werden, dass sowohl bei einem kurzzeitig als auch langfristig auf *A. arenaria* einwirkenden Salzstress eine reziproke Regulation zwischen der Prolindehydrogenase und Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase bestand.

Wie oben beschrieben, wird die Prolinoxidation durch die runterregulierte Expression des für die Prolindehydrogenase kodierten Gens (*PDH*) inhibiert. VERBRUGGEN *et al.* (1996) schlugen vor, dass dieser Prozess durch das Vorhandensein eines negativen Repressors gesteuert wird. Nach der Stressentfernung wird der Repressor inaktiviert, was die *PDH*-Transkription begünstigt. SATOH *et al.* (2002) und NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI (2006) berichten für *A. thaliana* von Transkriptionsfaktoren und *cis*-agierenden Elementen in der Promoterregion, die für die Expression der stressinduzierbaren Gene zuständig sind.

KIYOSUE *et al.* (1996) stellten in den Versuchen mit *A. thaliana* fest, dass 1 h nach der Stressapplikation (Dehydrierung) und bevor eine detektierbare Akkumulation von Prolin stattfand, eine kurzlebige Akkumulation der *AtPDH* mRNA stattfand. Die Autoren schlugen vor, dass die gleichzeitige Induktion von *AtPDH* und *ATP5CS*, die sich in einem zyklischen Wechsel zwischen Prolin und seinen Vorstufen äußert, eine wichtige Funktion bei der Herstellung der zellulären Homöostase in frühen Stresstagen hat.

KIYOSUE *et al.* (1996) isolierten aus den über 1 h rehydrierten *A. thaliana*-Pflanzen eine cDNA, die für die Prolindehydrogenase kodiert und nannten das Gen *ERD5* (*early responsive to dehydration*). Das identische, für die Prolindehydrogenase in *Arabidopsis* kodierende Gen, wurde ebenfalls von PENG *et al.* (1996) (*At-PDH*) und VERBRUGGEN *et al.* (1996) (*At-POX*; Prolinoxidase) isoliert. Das Enzym wurde sowohl Prolinoxidase als auch Prolindehydrogenase genannt. Nach MANI *et al.* (2002) ist jedoch die Bezeichnung als Dehydrogenase adäquater. VERBRUGGEN *et al.* (1996) fanden heraus, dass das Gen bei *A. thaliana* einen einzelnen Locus auf Chromosom 3 besetzt (Abb. 4.1). Das Produkt wird dabei als AT-POX, ATPDH, ATPOX, PRO1 oder Prolinoxidase bezeichnet. *ERD5* kodiert für ein 499 Aminosäuren langes Protein, das jeweils eine 34,5 und 23,6 %ige Homologie zu den Prolindehydrogenase-Proteinen aus *Drosophila* und *Saccharomyces cerevisiae* aufweist. Weiterhin enthält der hochkonservierte N-Terminus des Proteins eine Region, die ebenfalls im PutA-Protein von *E. coli* vorkommt. PutA ist ein Flavoprotein, das als ein transkriptioneller Repressor sowie als eine Prolindehydrogenase und Pyrrolin-Carboxylat-Dehydrogenase fungieren kann. Diese Tatsache spricht dafür, dass die konservierte Region eine katalytische Domäne von *ERD5* darstellt (KIYOSUE *et al.* 1996).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den NCBI-Datenbanken vorgenommene Suche nach dem Locus für das Gen, das bei *A. thaliana* für die Prolindehydrogenase kodiert, ergab zwei Resultate. Das eine auf Chromosom 3 lokalisierte Gen kodiert für das oben beschriebene *ERD5*-Protein. Ferner befindet sich auf Chromosom 5 ein anderes Gen (GenBank asseccion No. AT5G37810), das in den Prolinkatabolismus involviert ist und dessen Produkt ebenfalls eine Prolindehydrogenaseaktivität aufweist (Abb. 4.1).

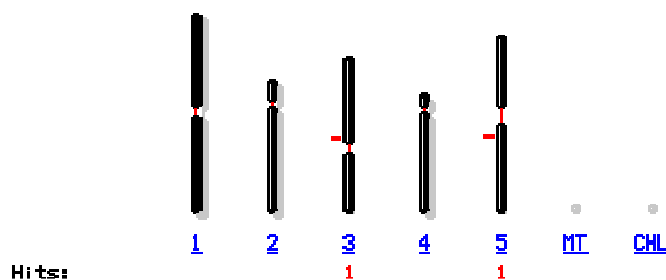


Abb. 4.1 Genomische Ansicht der fünf Chromosome von *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand). Die Lage des Gens auf Chromosom 3 (*ERD5*), das für die Prolindehydrogenase kodiert, wurde rot markiert. Das auf Chromosom 5 lokalisierte Gen (GenBank accession No. AT5G37810) kodiert ebenfalls für ein Protein, das Prolindehydrogenaseaktivität aufweist.

MT- mitochondriales Genom, CHL – plastidäres Genom. Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Die Analyse der PDH-Sequenz aus *A. arenaria* unter Einsatz des BLAST-Programms ergab eine 82 %ige Homologie zu der putativen Prolinoxidase aus *Oryza sativa* (GenBank

asseccion No. NM197664) (vgl. 3.9.2.3). Das Gen für dieses Protein ist bei Reis auf dem Chromosom 10 lokalisiert (Abb. 4.2).

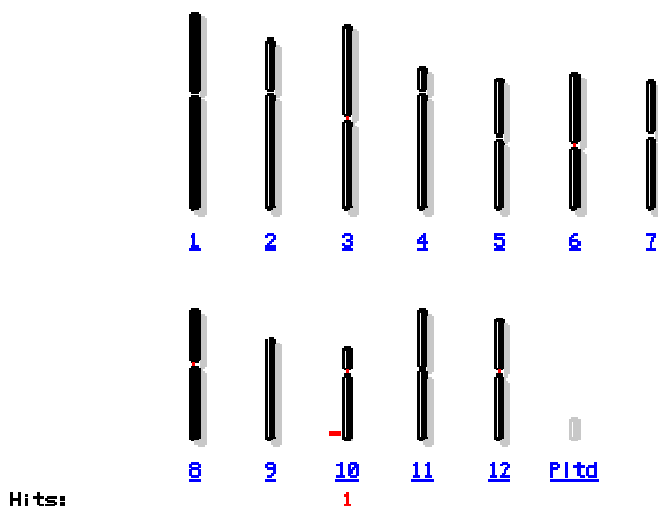


Abb. 4.2 Genomische Ansicht der zehn Chromosome von *Oryza sativa* (Reis). Die Lage des Gens auf Chromosom 10, das für die putative Prolinoxidase kodiert, wurde rot markiert. Pltd – plastidäres Genom. Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nach dem Vergleich der Proteinsequenz der putativen Prolinoxidase aus *O. sativa* mit den Datenbanken (BLAST) wurde eine jeweils 50 %ige Homologie zu der Prolindehydrogenase aus *Glycine max*, 49 %ige zu der Prolindehydrogenase aus *Medicago sativa*, 45 %ige zu der Prolinoxidase / -Dehydrogenase aus *Nicotiana tabacum* sowie eine 48 %ige Homologie zu der Prolindehydrogenase aus *A. thaliana*, festgestellt (vgl. 3.9.7).

In den Kontrollversuchen mit dem neu entwickelten GP240 - GP310- Primerpaar (s. Tab. 2.9) wurde bei *A. thaliana* kein Produkt amplifiziert, was auf die Primerspezifität hinweist und die in den Datenbanken zwischen dem monokotyloiden Reis und der dikotyloiden *A. thaliana* vorgefundene Sequenzunterschiede erklärt. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten neuen Sequenzen, die ein Fragment des *AaPDH*-Gens kodieren (s. 3.9.2.3) geben gleichzeitig die erste Information über das noch nicht sequenzierte Genom von *A. arenaria*. Künftig sind weitere Arbeiten notwendig, um die vollständige Sequenz von *AaPDH* zu entschlüsseln.

4.3 *housekeeping genes*

Zu den oft eingesetzten *housekeeping genes* (Haushaltsgene) gehören z.B. Actin, β -Tubulin, ribosomale Gene (18S- und 28S-rRNA), Cyclophilin, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (aprt) oder der Elongationsfaktor 1- α (KIM *et al.* 2003; NICOT *et al.* 2005). Die Quantifizierung von den physiologischen Änderungen der Genexpression erfordert eine Konfrontation zwischen der relativen Expression von Zielgenen und einem externen Standard, der durch die *housekeeping genes* repräsentiert wird. Viele Studien haben jedoch gezeigt, dass auch die *housekeeping genes* unter verschiedenen Bedingungen einer Regulation unterliegen (KIM *et al.* 2003). Nach THELLIN *et al.* (1999) und VANDESOMPELE *et al.* (2002) sollen bei den Tests mindestens zwei bis drei *housekeeping genes* eingesetzt werden. Die Verwendung von nur einem Gen könnte das Endergebnis verfälschen. Die Auswertung der in der vorgelegten Arbeit verwendeten *housekeeping genes* zeigte, dass sich von den zwei verwendeten Genen (β -Tubulin und 18S-rRNA) die 18S-rRNA besonders gut zur Quantifizierung eignet. Bei der Untersuchung der 18S-rRNA aus *A. arenaria* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen blieb die Expression des Gens unverändert (vgl. Abb. 3.24). Im Gegensatz dazu wurde das von β -Tubulin gelieferte Ergebnis bei der Quantifizierung nicht verwertet, da sich die Expression des Gens als abhängig von den gewählten Wachstumsbedingungen zeigte (s. Abb. 3.24).

Ähnliche Resultate in Bezug auf die Expression von 18S-rRNA wurden ebenfalls von KIM *et al.* (2003) präsentiert. Die Autoren stellten in den Versuchen mit *Oryza sativa* und bei dem Einsatz von vier unterschiedlichen *housekeeping genes* fest, dass die 18S-rRNA-Mengen in den untersuchten Proben, im Gegensatz zu den Actin-, Tubulin- und GAPDH-Transkripten konstant blieben und dadurch ein reproduzierbares Ergebnis lieferten. NICOT *et al.* (2005) untersuchten dagegen die Expression von sieben unterschiedlichen Haushaltsgenen bei *Solanum tuberosum* (Kartoffel) unter der Einwirkung von biotischem und abiotischem Stress. Die Autoren stellten fest, dass bei dieser Pflanze z.B. unter Salzstresseinwirkung die Gene für Cyclophilin und Elongationsfaktor 1- α (*ef1a*) das stabilste Expressionsmuster zeigten.

4.4 Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus von *A. arenaria* nach Salzstresseinwirkung und Pilzbesiedlung

4.4.1 Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus nach Salzstresseinwirkung

Pflanzen reagieren auf den osmotischen Stress durch die Produktion von kompatiblen Soluten (HARE *et al.* 1998). Zu den oft synthetisierten Osmoprotektanten gehören außer Prolin und dessen Derivaten auch Zucker (Saccharose, Fructose, Trehalose, Raffinose), Zuckeralkohole (Polyole; Glycerol, Mannitol, Sorbitol, Inositol und methylierte Inositole) oder komplexe Zucker (z. B. Fructane) (BOHNERT *et al.* 1995; STOOP *et al.* 1996; HASEGAWA *et al.* 2000; YOKOI *et al.* 2002) (vgl. 1.1.2). WANG *et al.* (2000) fanden heraus, dass die Einwirkung von osmotischem Stress (0,6 M Sorbitol) auf die Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) eine Saccharoseakkumulierung in den Zellen zur Folge hatte. Bei vielen Pflanzen zeichnet sich der Saccharosemetabolismus durch eine kontinuierliche Synthese und Degradierung von diesem Zucker aus. Aus diesem Grund untersuchten die Autoren ebenfalls, inwiefern sich der osmotische Stress auf die Enzyme auswirkt, die in die Saccharosesynthese direkt involviert sind. Sie stellten fest, dass der osmotische Stress die Aktivität von Saccharose synthetisierenden (Saccharose-Phosphat-Synthase; EC 2.4.1.14) und degradierenden (Saccharose-Synthase; EC 2.4.1.13 und Invertase; EC 3.2.1.26) Enzymen in den Süßkartoffelzellen erhöhte. Eine erhöhte Aktivität der Saccharose-Phosphat-Synthase wurde auch in den gestressten Spinatblättern (ZRENNER & STITT, 1991) sowie Kartoffelknollen (GEIGENBERGER *et al.* 1997) ermittelt. WANG *et al.* (2000) postulierten die physiologische Bedeutsamkeit des „Saccharosezyklus“ für die Förderung der Kohlenstoffverteilung zugunsten der Saccharoseakkumulierung und der damit verbundenen osmotischen Anpassung. Im Gegensatz dazu wurden für die von ARBONA *et al.* (2005) über 60 Tage mit 30, 60 und 90 mM NaCl gestressten Citrusbäume eine Reduktion der Hexosen-, Saccharose- und Stärkegehalte ermittelt. Die Ursache dafür liegt, den Autoren nach, in der salzstressbedingten Verringerung der CO₂-Assimilation und in einem möglichen Wechsel der Blätter von *source*- zu *sink*-Organen. Die osmotische Anpassung der Citruspflanzen ist somit ausschließlich auf die Akkumulierung von Prolin und anorganischen Ionen zurückzuführen (ARBONA *et al.* 2005). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *A. arenaria*-Pflanzen wurde keine salzstressabhängige Akkumulation von Kohlenhydraten festgestellt. In den Kontrollen war die Saccharose nicht nachweisbar, auch die L-Fructose- und L-Glucosegehalte waren gering (0,14 mg/gBTM). Es ist anzunehmen, dass zum Zeitpunkt der Probenahme nach vier Wochen Kultivierung die Saccharose gespalten vorlag und daher auch nicht

detektierbar war. Warum der messbare Kohlenhydratpool der Kontrollpflanzen nach vier Wochen Kultivierung kaum Zucker aufwies, kann nicht erklärt werden. Da die geernteten Kontrollpflanzen gesund aussahen und auch mehr Biomasse bildeten als die mit Salz gestressten bzw. mit den Pilzen inokulierten Pflanzen, kann davon ausgegangen werden, dass der Assimilatpool nach vier Wochen Kultivierung nicht ausgeschöpft war. Die Kultivierung der *A. arenaria*- Pflanzen fand unter Laborbedingungen in kleinen Phytacontöpfen und unter Einwirkung von künstlichem Licht statt (vgl. 2.1.3). Es ist anzunehmen, dass solche Bedingungen einen zusätzlichen Stress für die Pflanzen bedeuteten und zur Verminderung des Zucker- und Zuckeralkoholpools beigetragen haben. Bei der Einwirkung von 125 mM NaCl auf *A. arenaria* wurden in den Ansätzen gesteigerte Konzentrationen von den detektierbaren Zuckern ermittelt (vgl. 3.6). Da die Werte jedoch nicht signifikant unterschiedlich waren, kann nur spekuliert werden, ob die Gehaltszunahme mit der osmotischen Anpassung von Strandhafer in Zusammenhang steht.

Bei den ohne Pilzinokulation kultivierten *A. arenaria*- Pflanzen wurde weder bei den Kontrollen noch bei den mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen gestressten Pflanzen Mannitol nachgewiesen (s. 3.6).

4.4.2 Zucker- und Zuckeralkoholmetabolismus nach Pilzbesiedlung

Der Metabolismus und die Translokation der Kohlenhydrate in der Pflanze stellen einen Teil eines hoch integrierten physiologischen Prozesses dar, der zur Verteilung von Assimilaten sowie Kompartimentierung und Speicherung von Nährstoffen führt. Das System kann durch den Pathogenbefall beeinträchtigt werden, was u.a. den Wassertransport und die photosynthetische Aktivität negativ beeinflusst (ISAAC, 1992). Wird die Pflanze von biotrophen Pilzen befallen, werden Kohlenhydrate bevorzugt zu dem infizierten Gewebe transportiert und dort auch akkumuliert, um das Pilzwachstum aufrechtzuerhalten. Dabei fungiert der Pilz als ein *sink*. Gleichzeitig wird der Assimilatenexport aus den besiedelten Blättern erschwert. Die nekrotrophen Pilze dagegen reduzieren vorwiegend den Kohlenhydrattransport aus den infizierten Pflanzenteilen. Die Phytopathogene entziehen der Pflanze ihre C-Ressourcen, indem sie Zucker, Zuckeralkohole, Fettsäuren, Proteine, Aminosäuren und die Bestandteile der pflanzlichen Zellwand metabolisieren (SOLOMON *et al.* 2003). Studien mit *Magnaporthe grisea* haben gezeigt, dass der Pilz pflanzliche Lipide abbaut und daraus Glycerol synthetisiert, um den Turgor in den Hyphen zu erzeugen (DE JONG *et al.* 1997). Die besiedelnden Pilze sind auch imstande aus den Wirtsmetaboliten die Polyole Mannitol oder Arabitol zu synthetisieren. Diese können von vielen Pflanzen nicht verwertet werden und fungieren für die Pilze als Kohlenstoffspeicher, Reduktionskraft und intrazelluläre

Osmolyte (ISAAC, 1992; CLARK *et al.* 2003). Da die Pilze u.a. zur Phytohormonsynthese fähig sind, können sie auch auf diesem Wege den Fluss der Assimilate in der Pflanze zu eigenen Gunsten verändern (TUDZYNSKI, 1997) sowie die Aktivitäten der pflanzlichen Enzyme (Invertase, Amylase), die in den Kohlenhydratmetabolismus eingreifen, regulieren (ISAAC, 1992) (vgl. 1.2).

Die Konzentrationen der detektierbaren Kohlenhydrate (D-Glucose, D-Fructose, D-Saccharose und D-Mannitol) wiesen bei den mit den Pilzen inokulierten bzw. salzgestressten *A. arenaria*-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen auf. Eine Besiedlung mit den Isolatensowie die Steigerung der NaCl-Konzentration im M&S-Medium resultierte, in den meisten Fällen, in einer Abnahme der Mannitolgehalte (s. Abb. 3.15). Es kann angenommen werden, dass die besiedelnden Pilze den Mannitolpool der Pflanze verwerteten, was eine Abnahme seiner Konzentration bei dem inokulierten Strandhafer zur Folge hätte. Unklar ist auch, ob die Besiedlung mit den Isolatens zur Ausschöpfung des Zucker- und Zuckeralkoholpools bei *A. arenaria* beigetragen hat. Eine mögliche Verwertung der Kohlenhydrate als Energiequelle durch die Pflanze bei der Abwehr gegen den Pilzbefall (z.B. hypersensitive Antwort, Synthese von Phenolen) sowie bei der Synthese von kompatiblen Soluten (z.B. Prolin) als Antwort auf den osmotischen Stress, kann nicht ausgeschlossen werden.

Während einer Infektion von Weizen mit *Fusarium proliferatum*, fanden BISHOP *et al.* (2002) im Apoplasten der Pflanze erhöhte Konzentrationen an *myo*-Inositol, Glucose, Galactinol, Glucose, Fructose, Saccharose und Melibiose. Eine symptomatische Infektion mit dem gleichen Pilz verursachte zusätzlich eine Akkumulation von Ferulaten und Lignin. DIETZ (1997) untersuchte Gerstepflanzen, die von Rost- bzw. Mehltaupilzen befallen wurden. Die Infektion mit den Rostpilzen hatte eine Abnahme der apoplastischen Zuckerkonzentration (besonders Glucose und Fructose) zur Folge, was auf einen Verbrauch durch die Pilze hindeutet. Die Mehltaupilze dagegen erhöhten die Kohlenhydratkonzentrationen um den Faktor 1,5 bis 6, im Vergleich zu den unbefallenen Pflanzen. BOYLE *et al.* (2001) berichten von erhöhten Glucosekonzentrationen und gestiegenen Invertaseaktivitäten in den Wurzeln der mit dem Pathogen *Drechslera* sp. infizierten Gerstepflanzen. Die von den Endophyten (*Fusarium* spp.) kolonisierten Pflanzen wiesen keine Zunahme des Glucosegehaltes und nur einen geringfügigen Anstieg der Invertaseaktivität auf.

In den mit *Cladosporium fulvum* infizierten Tomatenpflanzen registrierten JOOSTEN *et al.* (1990) einen Anstieg der Saccharosekonzentration, dem eine Saccharosespaltung und eine gleichzeitige Akkumulation von Glucose und Fructose folgten. Im Verlauf des 14

Tage dauernden Versuches sanken die Fructose- und Glucosekonzentrationen zugunsten von Mannitol. Die Autoren diskutierten den vom Pilz synthetisierten Zuckeralkohol als einen Schutz gegen die von der Pflanze gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies, was auch von JENNINGS *et al.* (1998) beschrieben wurde. Im Gegenzug wandelt die Pflanze den Polyol zu Mannose um (CLARK *et al.* 2003).

Genomische Studien belegen, dass die pflanzlichen Kohlenhydraten eine unentbehrliche Funktion bei der Versorgung der Pilze während der Infektion haben (SOLOMON *et al.* 2003). Die Zuckeraufnahme erfolgt dabei über die in den Haustorien lokalisierten Hexosetransporter (HXT1p), die eine Spezifität für D-Glucose, Deoxy-D-Glucose, D-Fructose und D-Mannose aufweisen (HAHN & MENDGEN, 2001; VOEGELE & MENDGEN, 2003). Die Hexosen werden im Myzel u.a. zur Energiegewinnung, Fettsäuresynthese, Bildung von Reservepolysacchariden oder Zuckeralkoholsynthese genutzt (WAGNER, 2002).

Die Pflanzen besiedelnden Pilze können durchaus einen positiven Effekt auf den Wirt ausüben (vgl. 1.2). In den Wurzeln der mit *Glomus mosseae* mykorrhizierten Maispflanzen wurden erhöhte Konzentrationen an löslichen Kohlenhydraten und gleichzeitig eine bessere Toleranz gegen den Salzstress festgestellt. Da der Pilz ca. 20 % der pflanzlichen Assimilate für eigenes Wachstum beansprucht, stimuliert er die Photosyntheseleistung des Wirtes und kompensiert dadurch den erhöhten C-Bedarf. Dadurch werden die pflanzlichen Wurzeln zu einem starken Metaboliten-*sink* und machen die Pflanze, durch einen erhöhten Kohlenhydratgehalt in den Wurzeln, resistenter gegen den osmotischen Stress (FENG *et al.* 2002).

4.5 Zur Auswirkung von Salzstress und Pilzbesiedlung auf die Biomasse von *A. arenaria*

4.5.1 Biomasse von *A. arenaria* nach Salzstresseinwirkung

Die Auswirkungen von hohen Salzkonzentrationen äußern sich bei den Pflanzen durch den osmotischen Stress, der durch die limitierte Wasseraufnahme entsteht sowie in einem ionischen Stress, der durch die gesteigerten Konzentrationen der toxischen Ionen innerhalb der Zellen verursacht wird (DI MARTINO *et al.* 2003). Welchen Einfluss der Salzstress auf die Pflanzen nehmen kann wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Strandhafers untersucht (vgl. 2.3.1).

Die Pflanzen besitzen viele Mechanismen, die ihnen den vom osmotischen Stress verursachten negativen Folgen, entgegenzuwirken erlauben. Hierzu zählen u.a. die Kontrolle der Salzaufnahme und die Bildung von osmotischen Soluten (vgl. 1.1.2). Der Einsatz der genannten Strategien ist jedoch für die Pflanze mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Nach MUNNS (2002) verbraucht die Synthese von 1 Mol Mannitol, Prolin oder Glycinbetain jeweils 34, 41 und 52 Mol ATP. Das Umleiten der Energie in die Prozesse der osmotischen Anpassung äußert sich bei den Pflanzen in reduziertem Wachstum und folglich in einer geringeren Biomasse. Dies bestätigten die unter 2.3.1 A beschriebenen Langzeitversuche, in denen die Einwirkung von Salzstress auf die Biomasse von *A. arenaria* getestet wurde. Bei den ausschließlich mit verschiedenen Salzkonzentrationen (125, 250, 375 mM NaCl) kultivierten Pflanzen fand, im Vergleich zur Kontrolle (Wachstum ohne NaCl-Zugabe), eine mit der Steigerung der Salinität korrelierende lineare Reduktion der Biotrockenmasse statt (s. Abb. 3.3 und Abb. 3.4 Versuchsreihe A). Der Gewichtsverlust von den mit 375 mM NaCl behandelten Pflanzen betrug dabei, verglichen mit der Kontrolle, 71 % (s. 3.2.1). ISHIKAWA & KACHI (2000) untersuchten u.a. die relative Wachstumsrate (RWR) von zwei *Artemisia*-Spezies nach einer Behandlung mit 100 und 300 mM NaCl. Während die in den Marschen vorkommende *A. fukudo* bei 100 mM NaCl keine und bei 300 mM NaCl eine 21 %ige Reduktion der RWR zeigte, wurde in gleichen Experimenten bei der die Hinterdünen besiedelnden *A. stelleriana* eine Abnahme der RWR um jeweils 29 und 83 % ermittelt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche ermöglichen *A. arenaria* in die Gruppe der salztoleranten Pflanzen einzuordnen. Dafür spricht die Fähigkeit des Strandhafers, mit 375 mM NaCl zu wachsen. APTEKAR & REJMÁNEK (2000) verglichen in einem Versuch die Vitalität der Rhizome von *A. arenaria* und *Leymus mollis*, der zu den salztolerantesten Dünenspezies gehört. Die Ausbreitung der beiden Arten über die Rhizome hat zur Folge, dass diese oft über mehrere Tage im Meereswasser (3,3 % NaCl; entspricht 570 mM NaCl) schweben, bevor sie an Strand gelangen und sich zu neuen Pflanzen entwickeln können. Die Untersuchung ergab, dass die Rhizome von *A. arenaria* nach 7 bzw. 13 Tagen im Meeresswasser immer noch eine Vitalität von jeweils 51,2 bzw. 8,5 % aufwiesen, was ebenfalls auf eine Salztoleranz von Strandhafer hinweist. Die Vitalität von *L. mollis*-Rhizomen fiel in den beiden Fällen nicht unter 59,6 % und weist somit auf eine hohe Salztoleranz dieser Pflanze hin. In den von BLITS & GALLAGHER (1991) durchgeführten Versuchen wurde über vier Monate das Wachstum des in den Marschen und auf den Dünen vorkommenden Halophyten *Sporolobus virginicus* (L.) Kunth im Seewasser getestet. Die Pflanze überstand die Seewasserbehandlung, war jedoch danach nur noch zu einer vegetativen Fortpflanzung über Rhizome und Halme in der Lage. Ferner verursachte die Salinität eine Reduktion der Blätter-, Halmgröße und

Internodienlänge. Zusätzlich wurden eine Miniaturisierung des Grases und eine 10fach höhere Prolinakkumulierung im Vergleich zu den ohne Salz wachsenden Pflanzen festgestellt. Die Form der Blätter selbst erfuhr eine Änderung von offener zu mehr geschlossener (sog. Rollblattstruktur), was dem Wasserverlust entgegenwirkt. Die Prolinakkumulierung fand ebenfalls in den mit *A. arenaria* durchgeführten Versuchen statt (vgl. 3.4.1 und 4.2.1.2). Auch das Einrollen der Blätter wurde in der vorliegenden Arbeit bei den salzgestressten Strandhaferpflanzen beobachtet aber nicht ausgewertet. In der Umwelt ist der Öffnungszustand der Blätter wetterabhängig. Hierbei scheinen sowohl das Licht, der Wassergehalt der Luft und des Dünensandes (MARKSTÄHLER, 1995), aber auch die Salinität, potentielle Regelgrößen für den Öffnungszustand des Blattes zu sein. Die Rollblattstruktur tritt immer dann auf, wenn die Bedingungen für die Assimilation ungünstig sind und schützt die Pflanze somit vor einem erhöhten Transpirationsfluss über die Stomata (MARKSTÄHLER, 1995).

Im Fall von *A. arenaria* kann nicht endgültig ausgesagt werden, wie sich die Salinität auf die Produktivität der Pflanze (Blüten-, Samenbildung) auswirkte, da alle Versuche nach vier Wochen abgebrochen wurden und der Strandhafer seinen Lebenszyklus noch nicht vollendet hatte. In den Experimenten mit 500 mM NaCl (Daten in der Arbeit nicht aufgeführt) erwies sich diese Salzkonzentration als letal für die Pflanzen. Es wurde kein Wachstum von den gestressten *A. arenaria*-Keimlingen festgestellt. Somit blieben diese Ergebnisse unberücksichtigt.

Da der Salzstress zu den wichtigsten Faktoren gehört, der besonders die Produktivität der Kulturpflanzen beeinträchtigt, werden molekulare Studien mit dem Ziel durchgeführt, die Pflanzen toleranter gegenüber hohen Salinitäten, aber auch gegenüber der Trockenheit oder niedrigen Temperaturen zu machen (CUSHMAN & BOHNERT, 2000). Die Existenz von salztoleranten Pflanzen (Halophyten) sowie die Salztoleranzdifferenzen unter den Genotypen von den salzsensitiven Spezies (Glycophyten) selbst (BLITS & GALLAGHER, 1991) weisen auf eine Regulierung auf genetischer Basis hin. Die gegenwärtigen Ansätze zu Verbesserung der Salztoleranz bei den Pflanzen beruhen z.B. auf der Ausnutzung der natürlichen genetischen Variationen (durch direkte Selektion unter Stressbedingungen) oder auf der Züchtung von transgenen Pflanzen (YAMAGUCHI & BLUMWALD, 2005). Durch die Analyse der Regulation der in die osmotische Anpassung involvierten und stressinduzierten Gene (SATO *et al.* 2002; NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006), die Konstruktion von cDNA-Bibliotheken, die auf den stressinduzierten Expressed Sequence Tags (ESTs) basieren, die Anwendung von Microarrays (RABBANI *et al.* 2003; SEKI *et al.* 2004) bzw. die Genomvergleiche zwischen salztoleranten und salzsensitiven

Spezies (INAN *et al.* 2004; TAJI *et al.* 2004; GONG *et al.* 2005), können die für die Salztoleranz verantwortlichen Mechanismen aufgespürt und untereinander verglichen werden. Ferner dient die Herstellung von transgenen Pflanzen einer Untersuchung von Enzymen, die direkt in die Synthese von z.B. osmoprotektiven Substanzen eingreifen und somit einen Einfluss auf die Salztoleranz der Pflanze nehmen. Hierzu zählen z.B. Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase in *A. thaliana* (NANJO *et al.* 1999) oder im Reis (SU & WU, 2004), Betainaldehyd-Dehydrogenase in Karotte, Reis, *A. thaliana* und Tabak (SAKAMOTO & MURATA, 2001; KUMAR *et al.* 2004). Bei MUNNS (2005) findet sich eine Liste mit den Genen, deren Überexpression in den Pflanzen zur Erhöhung der Salztoleranz führte. Hierzu zählen u.a. die Gene für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase, Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (*otsA* und *otsB*) und Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase (*mtl1*) aus *E. coli* sowie die D-Myoinositol-Methyltransferase (*imt1*) aus *Mesembryanthemum crystallinum*, die bereits jeweils in Reis, Weizen oder Tabak erfolgreich überexprimiert worden sind. Die Überexpression der für die Vermittlung der Salztoleranz zuständigen Gene, wie z.B. des vakuolären Na^+/H^+ - Antiporters (*NHX1*; *Na⁺/H⁺ exchanger*) aus dem Halophyten *Suaeda salsa* in Reis, *A. thaliana* oder Tomate, trug ebenfalls zur Steigerung der Salztoleranz bei (ZHAO *et al.* 2006).

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden zur Verbesserung der Salztoleranz bei *A. arenaria* keine molekularbiologischen Versuche durchgeführt. Dafür wurden die salzgestressten Strandhaferpflanzen mit den endophytischen Pilzen *Ac. strictum* und *M. bolleyi* kolonisiert. Diese Experimente sollten die Frage klären, inwiefern die endophytischen Isolate die Folgen von Salzstress bei Strandhafer mildern können (vgl. 2.3.1; 3.2.1 und 3.4).

4.5.2 Biomasse von *A. arenaria* nach Besiedlung mit den Pilzisolaten

Zu den wichtigen Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit gehörte, wie sich die Besiedlung mit den Pilzen auf die salzgestressten *A. arenaria*- Pflanzen auswirkt. Im Folgenden soll der Einfluss von den Endophyten bzw. Pathogenen auf die Biomasse von Strandhafer erörtert werden.

Die Kolonisierung von *A. arenaria* mit den endophytischen Pilzen *Ac. strictum* TUB6911 und *M. bolleyi* TUB6930 (vgl. 2.3.1 B und C) (ohne Salzstress) hatte keine Wachstumsreduktion zur Folge und zeichnete sich auch durch keine Krankheitssymptome aus (s. 3.2.1). Ferner war die Biomasse von den mit *M. bolleyi* inokulierten Strandhaferpflanzen nach einer vierwöchigen Kultivierung signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (vgl. Abb. 3.4; Versuchsreihe B). An dieser Stelle kann nur gemutmaßt werden, wodurch die Zunahme der Biomasse bei diesen Pflanzen zustande kam. Eine verbesserte Versorgung der Pflanzen durch den Pilz mit Wasser und Mineralien aus dem

Boden bzw. die Ausscheidung von pflanzlichen Wachstumshormonen an die Pflanze können in Betracht gezogen werden. Unbestritten ist auch die Funktion von Prolin, dessen Konzentration bei den salzgestressten *A. arenaria*-Pflanzen, im Vergleich zur Kontrolle, erhöht war (s. 3.4.1).

Pilze, die mit den Pflanzen in Symbiose leben, beeinflussen das Wachstum, die Physiologie und die Ökologie ihrer Wirte (CHEPLIK, 2004). Von endophytischen Pilzen ist bekannt, dass sie dem Wirt Toleranz gegen Wasser-, Salz-, Hitzestress, Bodenacidität und Mangel an Mineralstoffen sowie gegen Parasiten verleihen können (MUCCIARELLI *et al.* 2003; SCHULZ & BOYLE, 2005). Sie können das Wachstum verbessern, eine Konkurrenz für mikrobielle Pathogene darstellen, die Trockenheit- und Temperaturtoleranz des Wirtes verbessern und haben u.a. durch die Synthese von antimikrobiellen Metaboliten eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Wirtspathogenen und Herbivoren (MUCCIARELLI *et al.* 2003; RUDGERS *et al.* 2004). In der Literatur finden sich mehrere Beispiele, die einen positiven Einfluss von den Endophyten auf ihre Wirtspflanzen schildern (vgl. auch 1.2). JUMPPONEN (2001) berichtet von DSE (*dark septate endophytes*, wie z.B. *Phialocephala fortinii* oder *Chloridium paucisporum*), die eine mutualistische, mit der Mykorrhiza vergleichbare Symbiose mit den Pflanzenwurzeln eingehen. Eine positive Einwirkung von *P. fortinii* oder von den *Cryptosporiopsis* sp. auf das Wachstum der Wirte zeigte sich bei der Inokulierung von Pinaceae, Cyperaceae und Rosaceae (JUMPPONEN, 2001; RÖMMERT *et al.* 2002). Ein aus *Mentha piperita* L. isolierter Endophyt (PGP-HSF; *plant growth promotor-hyaline sterile fungus*) verbesserte das vegetative Wachstum der Minze. Die Besiedlung von *Phragmites australis* mit *Stagonospora* spp. erhöhte ebenfalls die Biomasse des Wirtes (ERNST *et al.* 2003). Ein konstitutiver endophytischer Mutualismus, der sich durch eine systemische Infektion von Gräsern aus dem Genus *Festuca*, *Lolium* und einigen anderen Poaceae mit den Pilzen aus der Gattung *Neothypodium* (Teleomorph *Epichloë*) auszeichnet, trägt auch zur Verbesserung der Wirtsvitalität sowie zur Steigerung der Biomasse und der Nährstoffversorgung bei (BACON & HILL, 1996; ERNST *et al.* 2003). Die besiedelten Pflanzen verschieben einen großen Teil ihrer Ressourcen Richtung Wurzeln, Sprosse und Samen, zeigen eine erhöhte Toleranz gegen Wasser- oder Aluminiumstress, eine bessere Resistenz gegenüber den Parasiten und haben einen ökologischen Vorteil gegenüber den nicht kolonisierten Individuen (VILA-AIUB *et al.* 2005).

Nach einer vierwöchigen Kultivierung der mit den beiden Endophyten inokulierten *A. arenaria*-Pflanzen mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125 und 250 mM; s. 2.3.1) hatte die Besiedlung mit diesen Pilzen keine negative Wirkung auf die Biomasse des salzgestressten Strandhafers. Ferner ergab sich bei den mit 125 mM NaCl gestressten

Pflanzen eine leichte Zunahme der Biotrockenmasse gegenüber dem ohne Pilzbesiedlung und mit 125 mM kultivierten Strandhafer, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich war (s. Abb. 3.4). Die ermittelte Abnahme der Biotrockenmasse war somit, im Vergleich zu Kontrolle, ausschließlich auf das Vorhandensein von NaCl im Düngungsmedium zurückzuführen. Diese Ergebnisse stehen mit den in der Literatur publizierten Daten in Einklang (vgl. 3.2.2) und beweisen, dass die Endophyten die Pflanzen kolonisieren können, ohne Krankheitssymptome hervorzurufen auch wenn die Pflanzen durch die Einwirkung von anderen Stressfaktoren (hier Salzstress) bereits geschwächt wurden.

Eine zu starke Stresseinwirkung kann jedoch zu einer Beeinträchtigung der pflanzlichen Integrität führen und den balancierten Antagonismus zwischen dem Endophyt und der Pflanze negativ beeinflussen (SCHULZ & BOYLE, 2005) (s. 1.2). Dies zeigte sich auch nach der Einwirkung von 375 mM NaCl-Stress auf die mit den Endophyten *Ac. strictum* oder *M. bolleyi* inokulierten *A. arenaria*-Pflanzen. Als Folge trat eine Reduktion der Biotrockenmasse um jeweils 55 und 30 % im Vergleich zu dem ohne Pilzbesiedlung mit 375 NaCl kultivierten Strandhafer sowie um jeweils 87 und 75 % gegenüber den Kontrollpflanzen auf (vgl. Abb. 3.4). Die dargestellte Biomasseverringerung war somit mit der durch die Pathogene verursachten Reduktion der Biotrockenmasse vergleichbar.

Eine andere Möglichkeit für die Pflanzen, den Befall von Pathogenen Pilzen abzuwehren stellt die wirtsunabhängige Spezifität dar, bei der die von den Mikroorganismen produzierten unspezifischen Elicitoren eine Abwehrreaktion in unterschiedlichen Pflanzespezies auslösen können (CERVONE et al. 1997; PETERS et al. 1998; SCHULZ et al. 1998). In Bezug auf das Verhältnis zwischen den die Pflanze kolonisierenden Pilzen und der Pflanze selbst, muss auch die von SCHULZ & BOYLE (2005) vorgeschlagene Hypothese über den balancierten Antagonismus berücksichtigt werden. Obwohl die beiden Hypothesen bei der vorliegenden Arbeit nicht getestet wurden, könnten sie den endophytischen bzw. das pathogenen Status der untersuchten Pilzisolat erklären.

Die durchgeführten Versuche zur Biomassebildung (s. 2.3.1 B und C) ergaben nach der Besiedlung von *A. arenaria* mit den pathogenen Stämmen *F. culmorum* TUB6927 und *G. graminis* TUB6935, im Vergleich zur Kontrolle, eine Reduzierung der Biotrockenmasse um ca. 50 % bei den ohne Salzstress kultivierten Pflanzen (vgl. Abb. 3.4; Versuchsreihe B). Dieses Ergebnis bestätigt die in der Literatur geschilderten Auswirkungen von Pathogenbefall auf den Wirt. Wurden die mit den Pathogenen infizierten Strandhaferpflanzen zusätzlich mit 125 mM NaCl gestresst (s. 2.3.1 C), blieb der Verlust der Biotrockenmasse unverändert bei 50 % gegenüber der Kontrolle. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Reduzierung des Gewichtes in diesem Fall ausschließlich auf

die Salzstresseinwirkung zurückzuführen war. Eine weitere Steigerung des Salzgehaltes im Düngungsmedium auf jeweils 250 und 375 mM resultierte in einer Abnahme der Biotrockenmasse um jeweils 75 % gegenüber der Kontrolle und wies somit deutlich auf eine zusätzliche Belastung der stark abiotisch gestressten Pflanzen durch die Infektion mit den Pilzen hin (vgl. Abb. 3.4; Versuchsreihe C). Die Folgen der durch die Pathogenen verursachten Schäden (vgl. 1.2), der Entzug von wichtigen pflanzlichen Metaboliten, wie z.B. Zucker und Zuckeralkoholen, Fettsäuren, Ammonium, Nitrat, Proteinen oder Aminosäuren (SOLOMON *et al.* 2003), verstärkt durch den Einfluss von hohen NaCl-Konzentrationen (vgl. 3.2.1), resultierten bei *A. arenaria* in einem reduzierten Wachstum von Stängeln, Blättern und Wurzeln sowie in Chlorosen und Nekrosen der Blätter.

4.6 Biotrockenmasse sowie ausgewählte Parameter des Pilzmetabolismus nach Salzstresseinwirkung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Pilze *Ac. strictum*, *M. bolleyi*, *F. culmorum* und *G. graminis* in den Monokulturen auf Salztoleranz untersucht (vgl. 2.6.1 und 3.3). Bei zwei der ausgewählten Isolate, *Ac. strictum* und *F. culmorum* wurde zusätzlich der Einfluss von Salzstress auf die Biomasse, den Aminosäurenpool sowie die spezifische Aktivität von P5CS ermittelt (s. 2.7.4 und 3.8). Dabei wurde untersucht, ob diese Isolate, wie das der Fall bei *A. arenaria* ist, auf den Salzstress mit der Prolinbiosynthese reagieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der dargestellten Experimente zusammenfassend diskutiert.

Die Reduktion des Wachstums und eine Verringerung der Wachstumsraten wurden in der vorliegenden Arbeit bei den mit verschiedenen Salzkonzentrationen kultivierten Pilzisolaten festgestellt (s. 2.6.1 und 3.3.2). *Ac. strictum* und *M. bolleyi* wiesen bei einem NaCl-Gehalt von 2 M nur noch geringe Wachstumsraten von jeweils 0,07 und 0,25 mm/Tag auf, was auf eine starke Wachstumshemmung durch Salz hindeutet. *G. graminis* war fähig lediglich in einem Medium ohne Salz bzw. mit 0,75 M NaCl zu wachsen (vgl. Abb. 3.7). Vergleichend wurde bei *Ashbya gossypii* in Anwesenheit von 0,2 M NaCl eine vollständige Wachstumshemmung ermittelt (FÖRSTER *et al.* 1998).

Der Pilz *F. culmorum*, der bei DOMSCH (1980) als osmotolerant beschrieben wurde, zeigte dagegen, im Vergleich zu den mituntersuchten Stämmen, die höchste Salztoleranz und wuchs noch mit 2 M NaCl. Das Pilzisolat produzierte während der Kultivierung in einem Flüssigmedium mit 0,75 M NaCl (s. 2.6.2) zweimal mehr Biomasse, als beim Wachstum ohne Salz (vgl. Abb. 3.5), was an eine hohe Anpassung an den osmotischen Stress hindeutet (s. 1.1.3 und 1.6.3).

Das für die Wachstumsbedingungen eines Pilzes optimale Wasserpotential, wird durch verschiedene in der Umgebung vorherrschende Faktoren, wie z.B. Gaszusammensetzung, pH-Wert oder Temperatur beeinflusst (MAGAN, 1997). LORENZ & MOLITORIS (1992) untersuchten den Einfluss von Temperatur und Salinität auf das Wachstum von marinen Pilzen. Für einige Spezies (z.B. *Dendryphiella salina*) fanden sie heraus, dass sich ihr Salinitätsoptimum mit steigender Temperatur erhöht (*Phoma-pattern*). KUEHN *et al.* (1998) gaben dabei an, dass die verbesserte Salztoleranz bei höheren Temperaturen als Folge einer noch effizienteren Akkumulation von kompatiblen Soluten anzusehen ist.

Die in der vorliegenden Arbeit mit den salzgestressten Pilzen durchgeführten Versuche fokussierten u.a. die Veränderungen im Aminosäurepool der untersuchten Isolate (s. 2.7.1 und 3.5). Dass *F. culmorum* bei hohen Salzkonzentrationen (2 M NaCl) wuchs, spricht für eine gute Anpassung von diesem Pilz an den Salzstress. Auch der ermittelte Prolinanstieg könnte in den ersten Kultivierungstagen zur osmotischen Anpassung beigetragen haben. Bei *Ac. strictum* kam es dagegen zu einer salzstressbedingten Verringerung des Prolingehaltes (vgl. Abb. 3.12). Die Salztoleranzversuche sowie die Bestimmung der Biotrockenmasse (vgl. 3.3) sprechen für eine geringfügige Anpassung von diesem Pilz an den osmotischen Stress.

Bei der Ermittlung der spezifischen Aktivität von P5CS, die eine regulierende Funktion bei der Prolinbiosynthese hat, wurde sowohl bei *F. culmorum* als auch bei *Ac. strictum*, keine Aktivität des Enzyms nachgewiesen. Verantwortlich für dieses Ergebnis könnte die geringe Pilzbiomasse sein, die bei dem Test eingesetzt wurde und den Assay damit nicht sensitiv genug machte (vgl. 3.8). Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass eine geringe Enzymaktivität von Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (die in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt wurde) eine niedrige Prolinkonzentration in den Pilzextrakten zur Folge hätte, was auch für die untersuchten Pilze festgestellt wurde. Die ermittelten Schwankungen in den Glycin- und Alaningehalten zwischen den salzgestressten und ohne NaCl kultivierten Stämmen waren nicht auf die Salzstresseinwirkung zurückzuführen (s. Abb. 3.13).

Bei BLOMBERG & ADLER (1992) finden sich Informationen über das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* und *Zygosaccharomyces rouxii* mit bis zu 0,5 M NaCl, was keine Veränderungen im Aminosäurepool verursachte. Eine Zunahme der basischen Aminosäuren sowie ein Anstieg von Citrullin wurde beim Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* mit 0,6 M NaCl festgestellt. JENNINGS & BURKE (1990) berichteten von *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae*, bei denen das Wachstum mit hohen Salzkonzentrationen einen Anstieg des Prolingehaltes zur Folge

hatte. Eine leichte Zunahme von dieser Aminosäure wurde nach drei Tagen bei dem in 0,75 M NaCl kultivierten *F. culmorum* festgestellt (s. 3.5 und Abb. 3.13). Die Prolinkonzentration unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem ohne Salz kultivierten Stamm. Nach sechs und neun Wachstumstagen war diese Aminosäure kaum noch in den Pilzextrakten vorhanden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Salzstress und / oder Pilzbesiedlung auf *Ammophila arenaria* (L.) Link (Strandhafer) untersucht. Zu den wichtigen Fragestellungen gehörten, wie sich die Besiedlung mit den Pilzen auf die salzgestressten *A. arenaria*-Pflanzen auswirkt und welchen Einfluss der Salzstress auf die ausgewählten Parameter des Strandhafermetabolismus nimmt.

Aus den 113 aus gesunden Strandhafer-Pflanzen isolierten Pilzisolaten, wurden 76 Stämme aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften identifiziert und 19 unterschiedlichen Genera zugeordnet. Die häufigsten Vertreter der isolierten Pilze gehörten den Gattungen *Fusarium* (15 %), *Microdochium* und *Phoma* (jeweils 11 %) sowie *Acremonium* (7 %) an. 39 der identifizierten Stämme wurden ausselektiert und anschließend bei den Reinfektionsversuchen eingesetzt. Danach wurden für die weiteren Experimente zwei Pilzisolate ausgesucht, die pathogene Eigenschaften aufwiesen (*Fusarium culmorum* und *Gauemannomyces graminis*) sowie zwei Endophyten (*Acremonium strictum* und *Microdochium bolleyi*).

Bei der Durchführung der Versuche wurden die *A. arenaria*-Pflanzen über vier Wochen ohne Salz kultiviert bzw. mit 125, 250 und 375 mM NaCl gestresst und / oder mit jeweils einem der Pilze inokuliert. Nach dem Ablauf der Experimente wurden bei den Pflanzen die Biomasse, die Veränderungen des Aminosäuren- sowie Zucker- und Zuckeralkoholpools und die Aktivitäten von zwei Schlüsselenzymen: Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT; Glutamatsynthese) und Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS; Prolinsynthese), ermittelt. Die Bestimmungen erfolgten mittels HPLC oder spektrophotometrisch. Weiterhin wurde die Regulation der Expression der Prolindehydrogenase von *A. arenaria* (AaPDH; Prolinabbau) mittels semiquantitativer reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) analysiert. Bei dieser Analyse wurden neue Primer eingesetzt, die speziell zum Nachweis der Prolindehydrogenase von *A. arenaria* konstruiert wurden.

Nach dem Ablauf der über vier Wochen dauernden Versuche wurde bei den ohne Pilzinokulation kultivierten Pflanzen festgestellt, dass die Steigerung der NaCl-Konzentration im Düngungsmedium eine lineare Abnahme der pflanzlichen Biomasse zur Folge hatte. Das Umleiten der Energie u. a. in die Prozesse der osmotischen Anpassung (z.B. Bildung von kompatiblen Soluten) äußert sich bei den Pflanzen in reduziertem Wachstum und folglich in einer geringeren Biomassebildung. Gleichzeitig stiegen signifikant der Gehalt von L-Prolin und auch die spezifische Aktivität der in die

Prolinsynthese involvierten P5CS an. Die Zunahme der L-Prolin-Konzentration, verursacht durch den steigenden NaCl-Gehalt, ist auf die Akkumulation dieser Aminosäure im Cytoplasma der Zellen zurückzuführen und bestätigt somit die bedeutungsvolle Funktion von Prolin im Schutz der Pflanze gegen den Salzstress.

Ferner konnte in den über 48 h dauernden Kurzzeitversuchen mit *A. arenaria* zur Ermittlung der Regulation der AaPDH nachgewiesen werden, dass die Expression von *AaPDH* unter Salzstresseinwirkung runterreguliert und bei den rehydrierten Pflanzen hochreguliert wird, was auf eine reziproke Regulation von P5CS und PDH unter Salzstressbedingungen hinweist.

Die Kolonisierung von *A. arenaria* mit den endophytischen Pilzen *A. strictum* oder *M. bolleyi* (ohne Salzstress) hatte keine Wachstumsreduktion zur Folge und zeichnete sich auch durch keine Krankheitssymptome aus. Ferner erfuhr die Biomasse von den mit *M. bolleyi* inokulierten Pflanzen nach einer vier wöchigen Kultivierung eine signifikante Zunahme gegenüber der Kontrolle.

Wurden die mit den Endophyten inokulierten Pflanzen zusätzlich mit NaCl gestresst, so wurde, im Vergleich zu denen, die ohne Pilzbesiedlung wuchsen, keine Reduktion der Biomasse festgestellt. Zwar konnte bei allen dargestellten Versuchen eine Abnahme des Gewichtes, im Vergleich zur Kontrolle, ermittelt werden. Diese war jedoch ausschließlich auf die Salzstresseinwirkung und nicht auf den Einfluss durch die besiedelnden Pilze zurückzuführen. Dieses Ergebnis beweist, dass die endophytischen Pilze die Pflanzen kolonisieren können, ohne Krankheitssymptome zu verursachen, auch wenn die Pflanzen bereits durch die Einwirkung von anderen Stressfaktoren (hier Salzstress) geschwächt wurden.

Im Gegensatz zu den Endophyten verursachte die Besiedlung von salzgestressten *A. arenaria*-Pflanzen mit den pathogenen Isolaten eine Reduktion der Biomasse und das Auftreten von Krankheitssymptomen (Nekrosen, Chlorosen).

Die mit den Pilzen inokulierten und gleichzeitig salzgestressten Pflanzen bildeten ca. 25 % mehr Prolin, im Vergleich zu dem ohne Pilze kultivierten Strandhafer. Dies deutet auf eine Belastung durch NaCl und auch durch die Pilze hin. Soll Prolin auch eine protektive Funktion während der Kolonisierung haben, so erklärt dies die erhöhte Konzentration von dieser Aminosäure in den untersuchten Ansätzen.

Es hat sich ebenfalls herausgestellt, dass die Zunahme des Salzgehaltes im Düngungsmedium in einer signifikanten Abnahme der L-Glutamatkonzentrationen in den

Ansätzen resultierte. Dies impliziert, dass L-Glutamat in die durch den osmotischen Stress induzierte Prolinbiosynthese involviert ist.

6. Literaturverzeichnis

- Abebe T, Geunzi AC, Martin B and Cushman JC (2003): Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131, pp. 1748 – 1755
- Ábrahám E, Rigo G, Székeley G, Nagy R, Koncz C and Szabados L (2003): Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 51, pp. 363 – 372
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer P-J, Ishikawa A, Dixon RA and Lamb C (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92(20), pp. 773 - 784
- Alvarez ME (2000): Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44, pp. 429 – 442
- Ambikapathy J, Marshall JS, Hocart CH and Hardham AR (2002): The role of proline in osmoregulation in *Phytophthora nicotianae*. *Fungal Genetics and Biology* 35, pp. 287 – 299
- Aptekar R and Rejmánek M (2000): The effect of sea-water submergence on rhizome bud viability of the introduced *Ammophila arenaria* and the native *Leymus mollis* in California. *Journal of Coastal Conservation* 6, pp. 107 – 111
- Arbona V, Marco AJ, Iglesias DJ, López-Climent MF, Talon M and Gómez-Cadenas A (2005): Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Plant Growth Regulation* 46, 153 – 160
- Audenaert K, de Meyer GB and Höfte M (2002): Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128, pp. 491 – 501
- Ayliffe MA, Mitchell HJ, Deuschle K, Pryor AJ (2005): *Molecular Genetics and Genomics* 274, pp. 494 – 505
- Bacon & Hill (1996): Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grass. In: *Endophytic fungi in grasses and woody plants*. Redlin SC and Carris LM (eds.), APS Press, St. Paul, MN.
- Berteli F, Corrales E, Guerrero C, Ariza MJ, Pliego F and Valpuesta V (1995): Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiologia Plantarum* 93, pp. 259 – 264
- Biemelt S and Sonnenwald U (2006): Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 163, pp. 307 – 318
- Bishop DL, Chatterton NJ, Harrison PA and Hatfield RD (2002): Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodelling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, pp. 53 – 63
- Bittner, Florian (2002): Posttranslationale Modifikation von Aldehydoxidasen und Xanthindehydrogenase: Isolierung und Charakterisierung der Molybdän-Cofaktor-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation
- Blits KC and Gallagher JL (1991): Morphological and physiological responses to increased salinity in marsh and dune ecotypes of *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. *Oecologia* 87, pp. 330 – 335

- Blomberg A and Adler L (1992): Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology* 33, pp. 145 – 212
- Blomberg A & Adler L (1993): Tolerance of Fungi to NaCl. In: *Stress tolerance of fungi*. Jennings DH, Marcel Dekker, Inc. New York
- Bohnert HJ, Nelson DE and Jensen RG (1995): Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7, pp. 1099 – 1111
- Bohnert HJ and Sheveleva E (1998): Plant stress adaptations – making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology* 1, pp. 267 – 274
- Boyle C, Götz M, Damman-Tugend U and Schulz B (2001): Endophyte-host interactions III. Local vs.systemic colonization. *Symbiosis* 31, pp. 259 – 281
- Bottini R, Cassan F, Piccoli P (2004): Gibberelin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, pp. 497 – 503
- Brady CJ (1988): Nucleic acid and protein synthesis. In: *Senescence and aging in plants*. L.D. Nooden & A.C Leopold Academic Press, Inc. Toronto, pp. 147 – 179
- Brock TD (2001): *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Brundrett M (2004): Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79, pp. 473 – 495
- Buell AC, Pickart AJ and Stuart JD (1995): Introduction history and invasion patterns of *Ammophila arenaria* on the north coast of California. *Conservation Biology* 9(6), pp. 1587 – 1593
- Cabral IH, Stone JK and Carroll GC (1993): The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* 97, pp 367 – 376
- Cheplik GP (2004): Symbiotic fungal and clonal plant physiology. *New Phytologist* 164, pp. 413 – 415
- Cervone F, Castoria R, Leckie F and de Lorenzo G (1997): Perception of fungal elicitors and signal transduction. In: *Signal transduction in plants*. P. Aducci (ed.), Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 153 – 177
- Chernyad'ev II (2005): Effect of water stress on the photosynthetic apparatus of plants and the protective role of cytokinins: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41(2), pp. 115 – 128
- Cho K, Toler H, Lee J, Ownley JCS, Moore JL, Augé RM (2006): Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity. *Journal of Plant Physiology* 163, pp. 517 – 528
- Clark AJ, Blissett KJ, Oliver RP (2003): Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic stress and in planta. *Planta* 216, pp. 614 – 619
- Cushman JC and Bohnert HJ (2000): Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current opinion in Plant Biology* 3, pp. 117 – 124
- Damman, U (1997): Endophytische Pilze der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.) und die Auswirkungen einer endophytischen bzw. pathogenen Infektion auf phenolische und terpenoide Inhaltsstoffe der Gerstenwurzel. Diplomarbeit, TU Braunschweig
- Davis DJ, Burlak C, Money N (2000): Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research* 104(7), pp. 800 – 804

- De Bary A (1879). Die Erscheinung der Symbiose. Verlag von Karl J. Trübner
- De Boer W, Klein Gunnewiek PJA and Woldendorp JW (1998): Suppression of hyphal growth of soil-borne fungi by dune soils from vigorous and declining stands of *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 138, pp. 107 – 116
- De Jong JC, McCormack BJ, Smirnov N, Talbot NJ (1997): Glycerol generates turgor pressure in rice blast. *Nature* 389, pp. 244 – 245.
- Delauney AJ and Verma DPS (1993): Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4(2), pp. 215 – 223
- De Lorenzo G, Castoria R, Bellincampi D and Cervone F (1997): Fungal invasions enzymes and their inhibition. In: *The Mycota. Plant relationships part A*. Esser K, Lemke PA, Carroll GC and Tudzynski P, Springer Verlag, Berlin. pp. 61 – 83
- De Rooij-van der Goes PCEM (1995). The role of plant-parasitic nematodes and soil-borne fungi in the decline of *Ammophila arenaria* (L.) Link. *New Phytologist* 129, pp. 661 – 669
- De Rooij-van der Goes PCEM, van der Putten WH and van Dijk C (1995): Analysis of nematodes and soil-borne fungi from *Ammophila arenaria* (Marram grass) in Dutch coastal foredunes by multivariate techniques. *European Journal of Plant Pathology* 101, pp. 149 – 162
- Deuschle K, Funck D, Hellmann H, Däschner K, Binder S and Frommmer WB (2001): A nuclear gene encoding mitochondrial delta¹-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal* 27(4), pp. 345 – 355
- Di Martino C, Delfine S, Pizzuto R, Loreto F and Fuggi A (2003): Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytologist* 158, pp. 455 – 463
- Dietz K-J (1997): Function and responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany* 58, pp. 221 – 254
- Dincturk HB and Knaff DB (2000): The evolution of glutamate synthase. *Molecular Biology Reports* 27, pp. 141 – 148
- Domsch KH, Gams W & Anderson T-H (1980): *Compendium of soil fungi*. Academic press, London.
- Dong X. (1998): SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1(4), pp. 313 – 316
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP (2006): The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47, pp. 55 – 64
- Duffy B, Schouten A and Raaijmakers JM (2003): Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41, pp. 501 – 538
- Epstein L & Nicholson RL (1997). Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In: *The Mycota. Plant relationships Part A*. Esser K, Lemke PA, Carroll GC and Tudzynski P. Springer Verlag, Berlin. pp. 11 – 25
- Ernst M, Mendgen KW and Wiersma SGR (2003): Endophytic fungal mutualists: seed-born *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(7), pp. 580 – 587
- Esposito S, Massaro G, Vona V, di Martino Rigano V, Carfagna S (2003): Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* 216, pp. 639 – 647

- Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L and Alvarez ME (2004): Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(4), pp. 343 – 350
- Faeth SH (2002): Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *OIKOS* 98, pp. 25 – 36
- Feng G, Zhang FS, Li XL, Tian CY, Zang C, Rengel Z (2002): Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12, pp. 185 – 190
- Förster C, Marienfeld S, Wendisch VF, Krämer R (1998): Adaptation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* to hyperosmotic stress: different osmoresponse to NaCl and mannitol stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, pp. 219 – 226
- Freeman J and Ward E (2004): *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology* 5(4), pp. 235 – 252
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan RA and Csonka LN (1998): Comparative analysis of the regulation of expression and structure of two evolutionarily divergent genes for delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiology* 118, pp. 661 – 674
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Stauffacher C, Bressan RA and Csonka LN (2003): Identification of regions of the tomato glutamyl kinase that are involved in allosteric regulation by proline. *The Journal of Biological Chemistry* 278(16), pp. 14203 – 14210
- Gardes M and Bruns TD (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, pp. 113 -118
- Garcia-Rios M, Fujita T, LaRosa PC, Locy RD, Clitheros JM, Bressan RA and Csonka LN (1997): Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding glutamyl kinase and glutamyl phosphate reductase. *Proceeding of the National Academy of Science* 94, pp. 8249 – 8254
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang AM, Allen AJ, Alper SL and Fink GR (2001): Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺ -pump. *Proceeding of the National Academy of Science* 98(20), pp. 11444 – 11449
- Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, Merlo L, Canale V, Stitt M (1997): Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* 201, pp. 502 – 518
- Gibson SI (2004): Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* 55, pp. 253 – 264
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2003): Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biology and Fertility of Soils* 38, pp. 170 – 175
- Gong Q, Li P, Ma S, Rupassara SI and Bohnert HJ (2005): Salinity adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 44, pp. 826 – 839
- Gonozakky AG, Regente MC, de La Canal L (2005): Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *Journal of Plant Physiology* 162, pp. 618 – 624
- Goswami RS and Kistler C (2004): Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5(6), pp. 515 – 525
- GROM Fa. (1995): Hochchemfindliche Analyse von Aminosäuren im unteren piko-/femto-Molbereich durch Vorsäulenderivatisierung mit FMOC / ADAM. Applikationsservice.

-
- Hahn M and Mendgen K (2001): Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* 4, pp. 322 – 327
- Harborne, J.B. (1993): Introduction to ecological biochemistry. 4th edition. Academic Press, London.
- Hare PD and Cress WA (1997): Metabolic implication of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, pp. 79 – 102
- Hare PD, Cress WA and van Staden J (1998): Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21, 535 – 553
- Hare PD, Cress WA and van Staden J (1999): Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50(333), pp. 413 – 434
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K and Bohnert HJ (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews of Plant Physiology* 51, pp. 463 – 499
- Hayashi F, Ichino T, Osanai M and Wada K (2000): Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expression in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiology* 41(10), pp. 1096 – 1101
- Heldt HW (1996): Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Hellmann F, Funck D, Rentsch D and Frommer WB (2000): Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signalling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology* 123, pp. 779 – 790
- Hill AE, Shachar-Hill B, Shachar-Hill Y (2004): What are aquaporins for? *Journal of Membrane Biology* 197, pp. 1 – 32
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z and Verma DPS (2000): Removal of feedback inhibition of delta 1-pyrroline-5-carboxylat synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* 122, pp. 1129 – 1136
- Hopple JS & Vilgalys R (1999): Phylogenetic relationship in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, pp. 1 – 19
- Hu C-A A, Delauney AJ, Verma DPS (1992): A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylat synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceeding of the National Academy of Science* 89, pp. 9354 – 9358
- Hua X-J, van de Cotte B, van Montagu M and Verbruggen N (1997): Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylat reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114, pp. 1215 – 1224
- Inan G, Zhang Q, Li P, Wang Z, Cao W, Zhang H, Zhang C, Quist TM, Goodwin SM, Zhu J, Shi H, Damsz B, Charbaji T, Gong Q, Ma S, Fredricksen M, Galbraith DW, Jenks MA, Rhodes D, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Joly RJ, Bressan RA and Zhu J-K (2004): Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetics analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology* 135, pp. 1718 – 1737
- Isaac S (1992): Fungal-plant interactions. Chapman & Hall, London

- Ishikawa S-I, Oikawa T, Furukawa A (1991): Response of photosynthesis, leaf conductance and growth to different salinities in three coastal dune plants. *Ecological Research* 6, pp. 217 – 226
- Ishikawa S-I and Kachi N (2000): Differential salt tolerance of two *Artemisia* species growing in contrasting coastal habitats. *Ecological Research* 15, pp. 241 – 247
- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG and Bohnert HJ (1996): Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *The Plant Journal* 9(4), pp. 537 – 548
- Iwamoto K and Shiraiwa Y (2005): Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology* 7, pp. 407 – 415
- Iwen PC, Hinrichs SH and Rupp ME (2002): Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular target to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology* 40, pp. 87 – 109
- Jennings DB and Burke RM (1990): Compatible solutes – the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist* 116, pp. 277 – 283
- Jennings DB, Ehrenshaft M, Pharr DM and Williamson JD (1998): Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proceeding of the National Academy of Science* 95, pp. 15129 - 15133
- Joosten MHAJ, Hendrickx LJM and De Wit PJGM (1990): Carbohydrate composition of apoplastic fluids isolated from tomato leaves inoculated with virulent or avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, pp. 103 – 112
- Joosten MHAJ, Honée G, van Kan JAL, De Wit PJGM (1997): The gene-for-gene concept in plant-pathogen interactions: tomato - *Cladosporium fulvum*. In: *The Mycota. Plant relationships* Part B. Esser K, Lemke PA, Carroll GC and Tudzynski P. Springer Verlag Berlin. pp. 3 – 16
- Jumpponen A (2001): Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11, pp. 207 – 211
- Kemble AR & McPherson HT (1954): Liberation of amino acid in perennial rye grass during wilting. *Biochemical Journal* 58, pp. 46 – 59
- Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1996): A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 8, pp. 1323 – 1335
- Knight H and Knight MR (2001): Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6(6), pp. 262 – 267
- Kosmas SA, Argyrokastritis A, Loukas MG, Eliopoulos E, Tsakas S, Kaltsikes PJ (2005): Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthetase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 223(2), pp. 329 – 339
- Kowalchuk GA, Gerards S and Woldendorp JW (1997): Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology* Oct. pp. 3858 – 3865
- Kowalchuk GA (1999): Fungal community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.6, pp. 1 – 16

- Kowalchuk GA, de Souza FA and van Veen JA (2002): Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 11, 571 – 581
- Kull U (1996): Strandhafer als Pionierpflanze. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 11, p 441
- Lancien M, Gadal P and Hodges M (2000): Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarat in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiology* 123, pp. 817 – 824.
- Lawlor DW (1995): The effects of water deficit on photosynthesis. In: *Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation*. Smirnov N. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Lebeda A, Luhova L, Sedlarova M, Jancova D (2000): The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108(1), pp. 89 – 111
- Lewis DH and Smith DC (1967): Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. *New Phytologist* 6, pp. 143 – 184
- Lohaus G, Hussmann M, Pennewies K, Schneider H, Zhu J-J and Sattelmacher B (2000): Solute balance of maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany* 51(351), pp. 1721 – 1732
- Lorenz R & Molitoris HP (1992): Combined influence of salinity and temperature (phomma-pattern) on growth of marine fungi. *Canadian Journal of Botany* 70, pp. 2111 – 2115
- Lutts S, Majerus V, Kinet JM (1999): NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105, pp. 450 – 458
- Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, Suefferheld M and Rieger M (1997): Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant, Cell and Environment* 20, pp. 609 – 616
- Kim B-R, Nam H-Y, Kim S-U, Kim S-I and Chang Y-J (2003): Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters* 25, pp. 1869 – 1872
- Kishor PBK, Hong Z, Miao G-M, Hu C-A-A and Verma DPS (1995): Overexpression of delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108, pp. 1387 – 1394
- Klotke J, Kopka J, Gatzke N and Heyer AG (2004): Impact of soluble sugar concentration on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* 27, pp. 1397 – 1404
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS (2005): *TrichoBLAST*: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea* powered by sequence diagnosis and similarity search tools. *Mycological Research* 109, pp. 658 – 660
- Kuehn KA, Churchil PF and Suberkropp K (1998): Osmoregulatory responses of fungi inhabiting standing litter of the freshwater emergent macrophyte *Juncus effusus*. *Applied and Environmental Microbiology* Feb., pp. 607 – 612
- Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP (2002): Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106, pp. 757– 767

-
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004): Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultures cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiology* 136, pp. 2842 - 2854
- Kunkel BN, Brooks DM (2002): Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5(4), pp. 325 – 31
- Lea PJ and Ireland RJ (1999): Nitrogen metabolism in higher plants. In: *Plant amino acids. Biochemistry and Biotechnology*. Singh BK. American Cyanamid Company, Princeton, New Jersey. pp. 1 – 48
- Lebeda A, Luhová L, Sedlářová, Jančová D (2001): The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108(1), pp. 89 – 111
- Lehtonen P, Helander M, Wink M, Sporer F and Saikkonen K (2005): Transfer of endophyte-origin defensive alkaloids from grass to a hemiparasitic plant. *Ecology Letters* 8, pp. 1256 – 1263
- Magan N (1997): Fungi in extreme environments. In: *The Mycota. Environmental and microbial relationships IV*. Esser K, Lemke PA, Wicklow DT and Söderström B. Springer Verlag, Berlin. pp. 100 – 114
- Mager WH & Varela JCH (1993): Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology* 10, pp. 253 – 258
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ and Bressan RA (2002): Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31(6), pp. 699 – 712
- Managabanag JR and Torzilli AP (2002): An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 94(3), pp. 384 – 391
- Mani S, van de Cotte B, van Montagu M and Verbruggen N (2002): Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 128, pp. 73 – 83
- Mariko S, Kachi N, Ishikawa S-I, Furukawa A (1992): Germination ecology of coastal plants in relation to salt environment. *Ecological research* 7, pp. 225 – 233
- Markstahler U (1995): Der Strandhafer (*Ammophila arenaria*) – ein Beispiel für eine optimierte Konstruktionsform. *Mikrokosmos* 84(4), pp. 225 – 334
- Marzluf GA (1997): Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1), pp. 17 – 32
- Marquarding I (1999): Endophytische pilze aus *Trifolium repens* L. mit besonderer Berücksichtigung isolierter Hefen und deren taxonomischer Einordnung. Dissertation, TU Braunschweig
- McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD (1999): Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology* 120, pp. 945 – 949
- Mehdy MC (1994): Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105, pp. 467 – 472
- Mehta PA, Sivaprakash K, Parani M, Venkataraman G, Parida AK (2005): Generation and analysis of expressed sequence tags from the salt-tolerant mangrove species *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. *Theoretical and Applied Genetics* 110, pp. 416 – 424
- Mendgen K and Deising H (1993): Transley structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist* 124, pp. 193 – 213

- Mertens, E (1999): Einfluß der Infektion eines Endophyten und eines Pathogens auf die Inhaltsstoffe der Apoplastenflüssigkeit und der Blätter von Bohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris* L.). Diplomarbeit, TU-Braunschweig
- Meyer VR (2004): Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- Miflin BJ and Lea PJ (1977): Amino acid metabolism. Annual Reviews of Plant Physiology 28, pp. 299 – 329
- Mitchel JI & Zuccaro A (2006): Sequences, the environment and fungi. Mycologist 20: pp. 62 – 74
- Montesano M, Brader G and Tapio Palva E (2003): Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. Molecular Plant Pathology 4(1), pp. 73 – 79
- Mucciarelli M, Scannerini S, Berteà C and Maffei M (2003): In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. New Phytologist 158, pp. 579 – 591
- Mühling KH and Läuchli A (2002): Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. Journal of Plant Physiology 159, pp. 137 – 146
- Mülhardt C (2002): Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Munns R (1993): Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. Plant Cell, and Environment 16, pp. 15 – 24
- Munns R (2002): Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell and Environment 25, pp. 239 – 250
- Munns R (2005): Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytologist 167, pp. 645 – 663
- Murashige T & Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473 – 497
- Naidu BP (1998): Separation of sugars, polyols, proline analogues, and betaines in stressed plant extracts by high performance liquid chromatography and quantification by ultra violet detection. Australian Journal of Plant Physiology 25, pp. 793 – 800
- Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1998): A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. Plant Physiology 118, pp. 1233 – 1241
- Nakashima K and Yamaguchi-Shinozaki K (2006): Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. Physiologia Plantarum 126, pp. 62 – 71
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (A 1999): Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 461, pp. 205 – 210
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (B 1999): Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 18(2), pp. 185 – 193

- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S and Shinozaki K (2003): Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-Tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant and Cell Physiology* 44(5), pp. 541 – 548
- Narayanasamy P (1997): Plant pathogen detection and disease diagnosis. Marcel Dekker, Inc. New York
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L and Evers D (2005): Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56(421), pp. 2907 – 2914
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM (1995): Ion homeostasis in NaCl stress environment. *Plant Physiology* 109, pp. 735 – 742
- Oren A (2002): Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, pp. 56 – 63
- Pajuelo P, Pajuelo E, Forde BG Márquez AJ (1997): Regulation of the expression of ferredoxin-glutamat synthase in barley. *Planta* 203, pp. 517 – 525
- Pan JJ and Clay K (2004): *Epichloë glyceriae* infection affects carbon translocation in the clonal grass *Glyceria striata*. *New Phytologist* 164, pp. 467 – 475
- Passioura LB and Munns R (2000): Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, pp. 941 – 948
- Paton FM and Jennings DH (1988): Effect of sodium and potassium chloride and polyols on malate and glucose 6-phosphate dehydrogenase from the marine fungus *Dendryphielle salina*. *Transactions of the British Mycological Society* 91(2), pp. 205 – 215
- Pavlik BM (1984): Seasonal changes of osmotic pressure, symplastic water content and tissue elasticity in the blades of dune grasses growing in situ along the coast of Oregon. *Plant, Cell and Environment* 7, pp. 531 – 539
- Peng Z, Lu Q and Verma DPS (1996): Reciprocal regulation of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular Genetics and Genomics* 253, pp. 334 – 341
- Peters S, Dammayer B and Schulz B (1998): Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to endophytic and pathogenic fungi. *Symbiosis* 25, pp. 193 – 211
- Petrini O (1991): Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbiology of the phyllosphere*. Andrews HJ & Hirano SS (eds.), Springer Verlag, New York. Pp. 179 – 197
- Pinior A, Grunewald-Stöcker G, von Alten H, Strasser RJ (2005): Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rosa plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. *Mycorrhiza* 15, pp. 596 – 605
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin H-X, Luan S, Mäser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very A-A, Zhu J-K, Dennis ES and Tester M (2006): Nomenclature for HKT- transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science. Article in press*.
- Popova OV, Ismailow SF, Popova TN, Dietz K-J, Gollack D (2002): Salt-induced expression of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta* 215, pp. 906 – 913

- Popp M & Smirnov N (1995): Polyol accumulation and metabolism during water deficit. In: Environment and Plant Metabolism. Smirnov N. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Porcel R and Ruiz-Lozano JM (2004): Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55(403), pp. 1743 – 1750
- Porcel R, Aroca R, Azcón R and Ruiz-Lozano JM (2006): PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plant in relation to drought and stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 60, pp. 389 – 404
- Rabbani MA, Muruyama M, Abe H, Ayub Khan M, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2003): Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarrays and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* 133, pp. 1755 – 1767
- Rabie GH (2005): Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and kinetin on the response of mungbean plants to irrigation with seawater. *Mycorrhiza* 15, pp. 225 – 230
- Raggi V (1994): Change in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. *Physiologia Plantarum* 91, pp. 427 – 434
- Rahman MH and Saiga S (2005): Endophytic fungi (*Neotyphodium coenophialum*) affect the growth and mineral uptake, transport and efficiency ratios in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant and Soil* 272, pp. 163 – 171
- Ramirez ML, Chulze SN and Magan N (2004): Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potential and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 96(3), pp. 470 – 478
- Raymond MJ and Smirnov N (2002): Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Annals of Botany* 89, pp. 813 – 823
- Redman RS, Dunigan DD and Rodriguez RJ (2001): Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151, pp. 705 – 716
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM (2002): Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298, p. 1581
- Reed RH, Chudek JA, Foster R and Gadd GM (1987): Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* Sept., pp. 2119 – 2123
- Rhodes D, Verslues PE and Sharp RE (1999): Role of amino acids in abiotic stress resistance. In: Plant amino acids. Biochemistry and Biotechnology. Singh BK. American Cyanamid Company, Princeton, New Jersey. pp. 319 – 356
- Roberts MF (2000): Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Frontiers in Bioscience* 5, pp. 796 – 812
- Rodrigues KF, Sieber TN, Gruenig CR & Holdenrieder (2004): Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplification and ITS-5.8S-ITS2 Sequence. *Mycological Research* 108, pp. 45 – 52
- Rodriguez-Navarro and Rubio F (2006): High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 57(5), pp. 1149 – 1160
- Roelfsema MRG and Hedrich R (2005): In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. *New Phytologist* 167, pp. 665 – 691

- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R and Sinha AK (2003): Extracellular invertases: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54, pp. 513 – 524
- Rudgers JA, Koslow JM and Clay K (2004): Endophytic fungi alter relationship between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* 7, pp. 42 – 51
- Ruiz-Lozano JM, Azcon R, Gomez M (1996): Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Physiologia Plantarum* 98, pp. 767 – 772
- Ruiz-Lozano JM (2003): Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 12, pp. 309 – 317
- Russo M, Pickart A, Morse L, Young R (1988): Element stewardship abstract for *Ammophila arenaria* (European Beachgrass). The Nature Conservancy. Virginia
- Sakamoto A and Murata N (2001): The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiology* 125, pp. 180 – 188
- Sakamoto A and Murata N (2002): The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 25, pp. 163 – 171
- Samaras Y, Bressan RA, Csonka LN, Garcia-Rios MG, Paino D'Urzo M and Rhodes D (1995): Proline accumulation during drought and salinity. In: *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation*. Smirnoff N. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Sadler R & Scott KJ (1974): Nitrogen assimilation and metabolism. *Physiological Plant Pathology* 4, pp. 235 – 247
- Satoh R, Nakashima K, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2002): ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130, pp. 709 – 719
- Savoure A, Jaoua S, Hua X-J, Ardiles W, van Montagu M, Verbruggen N (1995): Isolation, characterization and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 372, pp. 13 – 19
- Seddon AP, Zhao KY and Meister A (1989): Activation of gamma-glutamate by gamma-glutamate kinase: formation of cycloglutamyl phosphate, an analog of glutamyl phosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 264(19), pp. 11326 – 1135
- Seki M, Satou M, Sakurai T, Akiyama K, Ishida J, Nakajima M, Anju A, Narusaka M, Fujita M, Oono Y, Kamel A, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2004): RIKEN *Arabidopsis* full-length (RAFL) cDNA and its application for expression profiling under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 55(395), pp. 213 – 223
- Schönbeck F, Steiner U, Kraska T (1993): Induzierte Resistenz: Kriterien, Mechanismen, Anwendung und Bewertung. *Zeitschrift für Pflanzenschutzkrankheiten und Pflanzenschutz* 100(5), pp. 541 – 557
- Schulz B, Guske S, Damman U and Boyle C (1998): Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25, pp. 213 – 227
- Schulz B, Römmert A-K, Damman U, Aust H-J and Strack D (1999): The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* 103(10), pp. 1275 – 1283
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K (2002): Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106, pp. 996 – 1004

- Schulz B and Boyle C (2005): The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(6), pp. 661 – 686
- Showler AT (2002): Effects of water deficit stress, shade, weed competition, and kaolin particle film on selected foliar free amino acid accumulations in cotton, *Gossypium hirsutum* (L.). *Journal of Chemical Ecology* 28(3), pp. 631 – 651
- Singh KN and Chatrath R (2001): Salinity tolerance. In: Application of physiology in wheat breeding. Reynolds PM, Ortiz-Monasterio JI, McNab A (eds.) Mexico, D.F. CIMMYT, pp. 101 – 110
- Smeeckens S (2000): Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, pp. 49 – 81
- Smith CJ, Deutch AH and Rushlow KE (1984): Purification and characteristics of a glutamyl kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. *Journal of Bacteriology* Feb., pp. 545 – 551
- Solomon PS and Oliver RP (2001): The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta* 213, pp. 241 – 249
- Solomon PS, Tan K-C and Oliver RP (2003): The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology* 4(3), pp. 203 – 210
- Steiner U & Schönbeck F (1997): Induced resistance. In: Resistance of crop plants against fungi. Hartleb H, Heitefuss R, Hoppe H-H. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 272 – 297
- Stines AP, Naylor DJ, Høj B, van Heeswijck R (1999): Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiology* 120, pp. 923 – 931
- Stone JK, Viret O, Petrini O and Chapela IH (1994): Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi. In: Host Wall Alterations by Parasitic Fungi. Petrini O & Quellette GB. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp. 115 – 126
- Stoop JMH, Williamson JD and Pharr MD (1996): Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* 1(5), pp. 139 – 144
- Strasburger E (2002): Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Strizhov N, Ábrahám E, Ökresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C and Szabados L (1997): Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in Arabidopsis. *The Plant Journal* 12(3), pp. 557 – 569
- Sturm A (1999): Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121, pp. 1 – 7
- Su J and Wu R (2004): Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science* 166, pp. 941 – 948
- Suzuki A, Rioual S, Lemarchand S, Godfroy N, Roux Y, Boutin J-P and Rothstein S (2001): Regulation by light and metabolites of ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Physiologia Plantarum* 112, pp. 524 – 530
- Suzuki A and Knaff DB (2005): Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynthesis Research* 83, pp. 191 – 217

- Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu J-K and Shinozaki K (2004): Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology* 135, pp. 1697 – 1709
- Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993): Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259, pp. 508 – 510
- Tester M and Bacic A (2005): Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology* 137, pp. 791 – 793
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, de Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75, 291 – 295
- Tobin AK and Yamaya T (2001): Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *Journal for Experimental Botany* 52, 591 – 604
- Trouverie J, Chateau-Joubert, Thévenot C, Jacquemot M-P, Prioul J-L (2004): Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* 219, pp. 894 – 905
- Truernit E (2001): The importance of sucrose transporters. *Current Biology* 11, pp. 169 – 171
- Tudzynski B (1997): Fungal phytohormones in pathogenic and mutualistic associations. In: *The Mycota. Plant relationships Part A*. Esser K, Lemke PA, Carroll GC and Tudzynski P. Springer Verlag, Berlin. pp. 167 – 184
- Van den Heuvel RHH, Curti B, Vanoni MA and Mattevi A (2004): Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cellular and Molecular Life Science* 61, pp. 669 – 681
- Van der Putten WH, van Dijk C and Troelstra SR (1988): Biotic soil factors affecting the growth and development of *Ammophila arenaria*. *Oecologia* 76, pp. 313 - 320
- Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A, Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7), research 0034.1 – 0034.11
- Verbruggen N, Hua X-J, May M and van Montagu M (1996): Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceeding of the National Academy of Science* 93, pp. 8787 – 8791
- Verma DPS (1999): Osmotic stress tolerance in plants: role of proline and sulphur metabolism. In: *Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants*. Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (eds.) R.G. Landes Company, pp. 153 – 168
- Vidhyasekaran P (1997): *Fungal pathogenesis in plant and crops*. Marcel Dekker, Inc. New York
- Vijayan K, Chakraborti SP, Ghosh PD (2003): In vitro screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance. *Plant Cell Reports* 22, pp. 350 – 357
- Vila-Aiub M, Gundel PE and Ghera C (2005): Fungal endophytic infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology* 30, pp. 49 – 57
- Voegelé RT and Mendgen K (2003): Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist* 159, pp. 93 – 100
- Volkmar KM, Hu Y and Steppuhn H (1998): Physiological responses of plants to salinity: a review. *Canadian Journal of Plant Science* 78, pp. 12 – 27

- Vreeland RH (1987): Mechanisms of halotolerance in microorganisms. Critical Reviews in Microbiology 14(4), pp. 311 – 56
- Wagner S (2002): Einfluss obligat biotropher (*Uromyces appendiculatus*, *Puccinia striiformis*) und pertotropher Pilze (*Bortrytis cinerea*, *Drechslera spec.*) auf den Primärstoffwechsel ihrer mono- und dikotyledonen Wirtspflanzen (*Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum*). Dissertation, TU Braunschweig
- Walters D (2003): Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. New Phytologist 159, pp. 109 – 115
- Wang H-L, Lee P-D, Chen W-L, Huang D-J and Su J-C (2000): Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. Journal of Experimental Botany 51, pp. 1991 – 1999
- Wangxia X, Vinocur B, Altman A (2003): Plant response to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218, pp. 1 – 4
- Ward E (1994): Use of polymerase chain reaction for identifying plant pathogens. Ecology of Plant Pathogens Dez., pp. 143 – 160
- Weber A and Flügge U-I (2002): Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. Journal of Experimental Botany 53(379), pp. 865 – 874
- Webster J. (1983): Pilze. Eine Einführung. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Weretilnyk EA, Hanson AD (1990): Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. Proceeding of the National Academy of Science 87, pp. 2745 – 2749
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innes MA, Gefand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). Academic Press, San Diego. pp. 315 – 322
- Whittaker A, Martinelli T, Bochicchio A, Vazzana C and Farrant J (2004): Comparison of sucrose metabolism during the rehydration of dessication-tolerant and dessication-sensitive material of *Sporolobus stapfianus*. Physiologia Plantarum 122, pp. 11 – 20
- Williamson B (1994): Latency and quiescence in survival and success of fungal plant pathogens. In: Ecology of plant pathogens. Blakeman JP & Williamson B (eds.), CAB International, pp. 187 – 207
- Wirsel SGR, Leibinger W, Ernst M and Mendgen K (2001): Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. New Phytologist 149, pp. 589 – 598
- Wood AJ, Saneoka H, Rhodes D, Joly RJ, Goldsbrough PB (1996): Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. Plant Physiology 110, pp. 1301 – 1308
- Wu Q-S & Xia R-X (2006): Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. Journal of Plant Physiology 163, pp. 417 – 425
- Yamaguchi T and Blumwald E (2005): Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends in Plant Science 10(12), pp. 615 - 619
- Yeo A (1998): Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. Journal of Experimental Botany 49(323), pp. 915 – 929

- Yokoi S, Bressan RA and Hasegawa PM (2002): Salt stress tolerance in plants. JIRCAS Working Report, pp. 25 – 33
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y and Shinozaki K (1995): Correlation between the induction of a gene for delta ¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. The Plant Journal 7(5), pp. 751 – 760
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1997): Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant and Cell Physiology 38(10), pp. 1095 – 1102
- Zaman-Allah M, Sifi B, Issoufou M and El Aouni MH (2005): Salt tolerance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar as affected by rhizobia. Symbiosis 40, pp. 17 – 22
- Zhao F, Wang Z, Zhang Q, Zhao Y, Zhang H (2006): Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Suaeda salsa*. Journal of Plant Research 119, pp. 95 – 104
- Zhu J-K (2001): Plant salt tolerance. Trends in Plant Science 6(2), pp. 66 – 71
- Zhu J-K (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Reviews in Plant Biology 53, pp. 247 – 273
- Zrenner R & Stitt M (1991): Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. Plant, Cell and Environment 14, pp. 939 – 946
- Zuccaro A, Schulz B and Mitchell JI (2003): Molecular detection of ascomycets associated with *Fucus serratus*. Mycological Research 107(12), pp. 1451 – 1466
- Zuccaro A, Summerbell RC, Gams W, Schroers H-J and Mitchell JI (2004): A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. Studies in Mycology 50, pp. 283 – 297

Internetquellen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
<http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>.
<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>
<http://www.schimmel-schimmelpilze.de>

7. Anhang

Anhang A Chemikalien

Alle in der vorgelegten Arbeit verwendeten Chemikalien hatten eine p.a. oder höhere Qualität.

Anhang B Biotrockenmasse

B. 1 Biotrockenmassen (BTM) der *A. arenaria*- Pflanzen

Die *A. arenaria*- Pflanzen wurden entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle) bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl) in Murashige und Skoog (M&S)- Medium gedüngt und / oder mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert und wie unter 2.1.3 kultiviert. BTM-Angabe in g; n = 3; ± = Standardabweichung

Versuch	BTM	±	Versuch	BTM	±
Kontrolle I	1,13	0,23	<i>M. bolleyi</i> M&S	1,23	0,23
125 mM	0,77	0,16	<i>M. bolleyi</i> 125 mM	0,97	0,20
250 mM	0,58	0,05	<i>M. bolleyi</i> 250 mM	0,54	0,06
375 mM	0,32	0,05	<i>M. bolleyi</i> 375 mM	0,22	0,05
Kontrolle II	0,94	0,14	<i>G. graminis</i> M&S	0,58	0,25
<i>Ac. strictum</i> M&S	0,86	0,01	<i>G. graminis</i> 125 mM	0,69	0,09
<i>Ac. strictum</i> 125 mM	0,98	0,10	<i>G. graminis</i> 250 mM	0,33	0,04
<i>Ac. strictum</i> 250 mM	0,51	0,14	<i>G. graminis</i> 375 mM	0,24	0,03
<i>Ac. strictum</i> 375 mM	0,14	0,03			
<i>F. culmorum</i> M&S	0,48	0,02			
<i>F. culmorum</i> 125 mM	0,66	0,06			
<i>F. culmorum</i> 250 mM	0,25	0,02			
<i>F. culmorum</i> 375 mM	0,36	0,00			

B. 2 Biotrockenmassen (BTM) der untersuchten Pilzisolat

Die Kultivierung der Pilzisolat erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben. BTM-Angaben der untersuchten Pilzisolat *Ac. strictum* und *F. culmorum* wurden in g angegeben. n = 3; ± = Standardabweichung; Tnl = Tage nach Inokulation

Tnl	Versuch	BTM	±	Versuch	BTM	±
3	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	3,93e-3	1,23e-3	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	0,00	0,00
6	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,02	4,55e-3	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	0,01	0,01
9	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,02	3,02e-3	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	0,02	3,65e-3
12	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,06	0,01	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	0,02	3,76e-3
15	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,02	3,29e-3	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	0,02	0,01
Tnl	Versuch	BTM	±	Versuch	BTM	±
3	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,04	0,01	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	0,05	0,01
6	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,07	0,01	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	0,11	0,02
9	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,04	0,04	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	0,17	0,09
12	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,11	0,02	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	0,23	0,09
15	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,16	0,02	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	0,13	0,06

Anhang C Wachstumsraten der untersuchten Pilzisolat

C. 1 Wachstum der untersuchten Pilzisolat in Abhängigkeit von der Mediumsalinität.

Die Kultivierung der Pilzisolat erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Die Größe der Kolonien (Wachstumshöfe) der untersuchten Pilzisolat *Ac. strictum*, *F. culmorum*, *M. bolleyi* und *G. graminis* wurde in mm angegeben.

Tnl = Tage nach Inokulation; n = 3; ± = Standardabweichung

Versuch								
Tnl	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	±	<i>Ac. strictum</i> mit 0,75 M NaCl	±	<i>Ac. strictum</i> mit 1,25 M NaCl	±	<i>Ac. strictum</i> mit 2 M NaCl	±
4	3,50	0,00	1,67	0,29	0,50	0,00	0,00	1,15
6	6,33	0,29	4,33	0,29	1,50	0,00	0,00	0,00
8	8,67	0,29	6,67	0,29	3,17	0,29	0,00	0,00
10	14,17	1,15	10,17	0,58	4,83	0,29	0,50	0,00
13	16,50	0,00	13,67	0,29	7,50	0,00	0,50	0,00
16	24,50	0,00	19,50	0,00	11,50	0,00	1,17	0,58

Versuch								
Tnl	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	±	<i>F. culmorum</i> mit 0,75 M NaCl	±	<i>F. culmorum</i> mit 1,25 M NaCl	±	<i>F. culmorum</i> mit 2 M NaCl	±
4	18,83	1,00	20,50	0,58	7,83	0,00	0,00	0,00
6	36,83	0,58	40,50	3,46	20,50	1,00	2,17	0,58
8	90,00	0,00	90,00	0,00	35,83	3,51	5,50	1,00
10	90,00	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00	13,33	2,47
13	90,00	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00	17,50	2,00
16	90,00	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00	26,17	1,15

Versuch								
Tnl	<i>M. bolleyi</i> ohne NaCl	±	<i>M. bolleyi</i> mit 0,75 M NaCl	±	<i>M. bolleyi</i> mit 1,25 M NaCl	±	<i>M. bolleyi</i> mit 2 M NaCl	±
4	12,50	0,00	4,50	0,00	1,50	0,00	0,00	0,00
6	20,33	0,76	9,50	0,00	4,50	0,00	0,50	0,00
8	29,17	0,58	9,50	0,00	6,00	0,87	0,50	0,00
10	89,00	0,00	20,33	0,29	9,17	1,15	1,50	0,00
13	90,00	0,00	20,83	1,53	11,83	0,58	2,00	0,50
16	90,00	0,00	30,83	0,58	15,67	1,04	4,00	0,50

Versuch								
Tnl	<i>G. graminis</i> ohne NaCl	±	<i>G. graminis</i> mit 0,75 M NaCl	±	<i>G. graminis</i> mit 1,25 M NaCl	±	<i>G. graminis</i> mit 2 M NaCl	±
4	16,50	0,00	2,17	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
6	29,33	0,76	8,00	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00
8	89,00	0,00	11,17	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
10	90,00	0,00	22,17	1,53	0,00	0,00	0,00	0,00
13	90,00	0,00	33,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	90,00	0,00	90,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

C. 2 Wachstumsraten der untersuchten Pilzisolat in Abhängigkeit von der Mediumsalinität

Die Kultivierung der Pilzisolat erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Die Wachstumsraten der untersuchten Pilzisolat *Ac. strictum*, *F. culmorum*, *M. bolleyi* und *G. graminis* wurden in mm/Tag angegeben.

Mediumsalinität [M]	<i>Ac. strictum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>M. bolleyi</i>	<i>G. graminis</i>
ohne NaCl	1,53	11,25	6,92	9,00
0,75	1,22	11,25	1,93	5,63
1,25	0,72	9,00	0,98	0,00
2	0,07	1,64	0,25	0,00

Anhang D Lineare Regressionsgeraden

D. 1 Aminosäuren

Die Kalibrierungsgeraden wurden aufgenommen im Bereich von 10, 20, 50 und 100 μM

x = Peakfläche

y = Substanzkonzentration [μM]

R^2 = Korrelationskoeffizient

L-Asparagin	$y = 988,12x - 626,62$	$R^2 = 0,9674$
L-Glutaminsäure	$y = 482,44x - 424,02$	$R^2 = 0,9291$
L-Arginin	$y = 1364,9x - 1351,6$	$R^2 = 0,9109$
L-Prolin	$y = 1302,8x - 424,73$	$R^2 = 0,9789$
L-Valin	$y = 930,49x - 682,88$	$R^2 = 0,9755$
L-Asparaginsäure	$y = 620,75x - 289,42$	$R^2 = 0,9609$
L-Glutamin	$y = 855,17x - 487,33$	$R^2 = 0,9747$
L-Serin	$y = 789,83x - 468,78$	$R^2 = 0,8574$
L-Threonin	$y = 792,33x - 477,83$	$R^2 = 0,8747$
L-Glycin	$y = 904,18x - 172$	$R^2 = 0,9864$
L-Alanin	$y = 673,17x - 546$	$R^2 = 0,8595$
L-Norvalin	$y = 545,33x - 26,75$	$R^2 = 0,9597$
L-Phenylalanin	$y = 963x - 358,17$	$R^2 = 0,9524$
L-Isoleucin	$y = 862,92x + 372,72$	$R^2 = 0,9344$
L-Leucin	$y = 838,5x - 716,56$	$R^2 = 0,9026$
L-Lysin	$y = 461,67x - 395,89$	$R^2 = 0,9013$

D. 2 Zucker und Zuckeralkohole

Die Kalibrierungsgeraden wurden aufgenommen im Bereich von 62,5; 125 und 250 mg/L

x = Peakfläche

y = Substanzkonzentration [mg/L]

R^2 = Korrelationskoeffizient

D-Saccharose	$y = 387,02x - 8399,7$	$R^2 = 0,9999$
D-Glukose	$y = 1367,7x - 30488$	$R^2 = 0,9999$
D-Galactose	$y = 1158x - 16798$	$R^2 = 0,9999$
D-Fructose	$y = 1288,9x - 7916,5$	$R^2 = 1$
D-Rybitol	$y = 1114,9x + 8194,7$	$R^2 = 0,9874$
D-Glycerol	$y = 637,25x - 1259$	$R^2 = 0,9999$
D-Mannitol	$y = 1267,3x - 7790,5$	$R^2 = 1$
D-Sorbitol	$y = 1314,7x - 12160$	$R^2 = 0,9988$

D. 3 Proteine

Die Kalibrierungsgerade für die Berechnung der Proteinmenge wurde mit Rinderserumalbumin (Stammlösung 0,1 mg/mL in 0,3 M NaOH) im Bereich von 0 bis 100 μg erstellt.

x = Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]

y = O.D. bei 595 nm

R^2 = Korrelationskoeffizient

$$y = 0,0025x + 0,0122 \quad R^2 = 0,975$$

Anhang E Protein

E. 1 Proteingehalte in den pflanzlichen Extrakten

Die Proteinwerte, angegeben in µg/ml, wurden zur Ausrechnung der spezifischen Aktivitäten der Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) und der Ferredoxin spezifischen 2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT) von *A. arenaria* herangezogen. Die Proteinwerte in den Aminosäureextrakten wurden bei der Auswertung der Aminosäuregehalte verwendet. Die *A. arenaria*- Pflanzen wurden entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle) bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl) in Murashige und Skoog (M&S)- Medium gedüngt und / oder mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert und wie unter 2.1.3 kultiviert.

n = 3; ± = Standardabweichung

Versuch	P5SC		Fd-GOGAT		Aminosäuren	
	Protein	±	Protein	±	Protein	±
Kontrolle I	121,56	21,62	21,59	3,11	228,42	17,91
125 mM	126,91	10,25	22,51	2,18	216,71	33,08
250 mM	156,57	37,31	23,42	1,96	244,18	8,67
375 mM	145,66	12,03	20,63	3,69	237,52	16,61
Kontrolle II	156,51	13,35	19,98	0,84	256,71	5,13
<i>Ac. strictum</i> M&S	156,81	14,90	19,06	7,67	249,33	17,57
<i>Ac. strictum</i> 125 mM	176,61	9,62	18,83	6,51	263,27	32,19
<i>Ac. strictum</i> 250 mM	148,32	4,18	15,24	0,45	231,15	22,05
<i>Ac. strictum</i> 375 mM	90,09	15,21	22,16	0,00	142,06	0,00
<i>F. culmorum</i> M&S	128,93	7,82	30,89	6,65	256,30	8,37
<i>F. culmorum</i> 125 mM	141,35	13,30	20,71	0,89	202,87	13,04
<i>F. culmorum</i> 250 mm	83,17	26,03	21,34	1,94	176,20	8,64
<i>F. culmorum</i> 375 mM	85,09	0,00	15,80	0,00	106,00	0,00
<i>M. bolleyi</i> M&S	153,17	9,85	24,09	1,16	249,64	22,65
<i>M. bolleyi</i> 125 mM	177,62	17,64	10,48	2,43	288,58	9,64
<i>M. bolleyi</i> 250 mM	160,24	19,95	17,18	0,91	257,97	1,93
<i>M. bolleyi</i> 375 mM	90,85	10,79	15,49	1,72	231,35	20,52
<i>G. graminis</i> M&S	149,74	20,19	24,70	4,50	231,56	5,59
<i>G. graminis</i> 125 mM	169,84	22,07	15,85	1,03	256,91	14,50
<i>G. graminis</i> 250 mM	146,51	7,98	14,58	1,03	248,22	6,42
<i>G. graminis</i> 375 mM	115,60	22,24	11,15	9,73	218,22	13,93

E. 2 Proteingehalte in den Pilzextrakten

Die Proteinwerte, angegeben in µg/ml, wurden zur Ausrechnung der spezifischen Aktivität der Pyrrolin-Carboxylat-Synthetase (P5CS) bei *Ac. strictum* und *F. culmorum* herangezogen. Die Kultivierung der Pilzisolat erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

Tnl – Tage nach Inokulation; n = 3; ± - Standardabweichung

Tnl	Versuch							
	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	±	<i>Ac. strictum</i> mit 0,75 M NaCl	±	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	±	<i>F. culmorum</i> mit 0,75 M NaCl	±
3	20,28	5,07	7,76	5,66	79,47	7,88	96,24	12,26
6	-2,55	3,78	23,31	7,88	132,81	11,85	161,49	19,59
9	0,28	4,64	13,62	6,31	139,27	39,00	196,65	29,52
12	70,38	15,42	46,95	15,37	159,47	8,28	163,31	30,36
15	17,45	3,67	35,64	5,36	185,13	13,28	181,90	4,93
18	32,61	2,19			150,99	33,24	148,77	26,67

Anhang F Aminosäuren

F. 1 Gehalte der freien löslichen Aminosäuren in den pflanzlichen Extrakten von *A. arenaria*

Die in der Spalte „Versuch“ aufgelisteten Daten beziehen sich auf die Pflanzenversuche, bei denen die *A. arenaria*- Pflanzen entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle) bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl) in Murashige und Skoog (M&S)- Medium gedüngt und / oder mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert und wie unter 2.1.3 kultiviert wurden.

L-Asn – L-Asparagin; L-Gln – L-Glutamin; L-Asp – L-Asparaginsäure; L-Ser – L-Serin; L-Glu – L-Glutaminsäure; L-Arg – L-Arginin; L-Thr – L-Threonin; L-Gly – L-Glycin; L-Ala – L-Alanin; L-Pro – L-Prolin; L-Val – L-Valin; L-Phe – L-Phenylalanin; L-Ile – L-Isoleucin; L-Leu – L-Leucin; L-Lys – L-Lysin.

Die Aminosäuregehalte wurden in μM pro g Biotrockenmasse [$\mu\text{M/gBTM}$] angegeben; n = 3; \pm = Standardabweichung

Versuch	L-Asn	\pm	L-Gln	\pm	L-Asp	\pm	L-Ser	\pm
Kontrolle I	0,15	0,10	0,19	0,07	0,09	4,54e-3	0,12	0,03
125mM	0,18	0,09	0,19	0,10	0,07	3,11e-3	0,11	0,03
250mM	0,27	0,03	0,16	0,02	0,05	6,59e-10	0,09	0,01
375mM	0,21	0,03	0,14	0,01	0,05	0,01	0,09	0,01
Kontrolle II	0,35	0,02	0,36	0,03	0,11	0,02	0,19	0,02
<i>Ac.strictum</i> M&S	0,28	0,09	0,28	0,04	0,11	4,46e-3	0,18	0,02
<i>Ac.strictum</i> 125	0,30	0,08	0,35	0,02	0,09	0,01	0,16	0,03
<i>Ac.strictum</i> 250	0,37	0,05	0,40	0,07	0,07	0,02	0,17	0,02
<i>Ac.strictum</i> 375	0,51	0,03	0,44	0,00	0,05	0,00	0,16	0,00
<i>F.culmorum</i> M&S	0,17	0,04	0,21	0,01	0,07	0,01	0,13	0,01
<i>F.culmorum</i> 125mM	0,40	0,03	0,35	0,03	0,08	0,01	0,17	0,03
<i>F.culmorum</i> 250mM	0,27	0,06	0,27	0,02	0,09	1,77e-3	0,14	0,03
<i>F.culmorum</i> 375mM	0,09	0,00	0,07	0,00	0,24	0,00	0,07	0,00
<i>M.bolleyi</i> M&S	0,24	0,06	0,22	0,04	0,06	0,01	0,11	0,01
<i>M.bolleyi</i> 125mM	0,37	0,03	0,27	0,16	0,08	0,03	0,18	0,05
<i>M.bolleyi</i> 250mM	0,30	0,02	0,31	0,06	0,05	0,01	0,12	0,01
<i>M.bolleyi</i> 375mM	0,36	0,07	0,30	0,04	0,05	6,74e-4	0,12	0,01
<i>G.graminis</i> M&S	0,17	0,07	0,30	0,04	0,08	1,95e-3	0,11	0,01
<i>G.graminis</i> 125mM	0,28	0,03	0,39	0,01	0,12	0,05	0,17	0,01
<i>G.graminis</i> 250mM	0,30	0,06	0,29	0,02	0,06	0,01	0,14	0,02
<i>G.graminis</i> 375mM	0,31	0,02	0,31	0,08	0,07	0,02	0,12	0,01

Noch F. 1

Versuch	L-Glu	±	L-Arg	±	L-Thr	±	L-Gly	±
Kontrolle I	0,20	0,03	0,11	0,01	0,10	0,01	0,04	2,08e-3
125mM	0,13	0,02	0,10	4,27e-3	0,08	3,35e-3	0,03	0,01
250mM	0,10	0,01	0,11	1,88e-3	0,08	2,31e-3	0,03	0,01
375mM	0,12	1,78e-3	0,10	1,86e-9	0,08	1,31e-3	0,04	2,54e-3
Kontrolle II	0,34	0,04	0,12	0,02	0,17	0,01	0,08	0,02
<i>Ac.strictum</i> M&S	0,27	0,01	0,12	0,01	0,11	0,03	0,07	0,02
<i>Ac.strictum</i> 125	0,22	0,07	0,11	0,01	0,13	0,02	0,07	0,03
<i>Ac.strictum</i> 250	0,13	0,07	0,11	0,01	0,12	0,01	0,07	0,01
<i>Ac.strictum</i> 375	0,10	0,00	0,11	0,00	0,10	0,00	0,11	0,00
<i>F.culmorum</i> M&S	0,18	0,03	0,11	1,23e-3	0,09	0,01	0,05	0,01
<i>F.culmorum</i> 125mM	0,19	0,03	0,12	3,77e-3	0,13	0,02	0,07	0,02
<i>F.culmorum</i> 250mM	0,16	0,01	0,13	0,01	0,12	0,03	0,08	0,02
<i>F.culmorum</i> 375mM	0,11	0,00	0,12	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00
<i>M.bolleyi</i> M&S	0,18	0,04	0,11	9,82e-4	0,08	0,01	0,04	3,49e-3
<i>M.bolleyi</i> 125mM	0,22	0,07	0,12	0,01	0,16	0,02	0,09	0,03
<i>M.bolleyi</i> 250mM	0,12	0,02	0,12	0,01	0,11	0,01	0,06	0,01
<i>M.bolleyi</i> 375mM	0,11	0,02	0,11	5,72e-4	0,11	0,01	0,09	0,03
<i>G.graminis</i> M&S	0,14	3,25e-3	0,11	1,43e-3	0,09	0,01	0,05	0,01
<i>G.graminis</i> 125mM	0,18	0,01	0,12	0,01	0,12	0,01	0,07	0,01
<i>G.graminis</i> 250mM	0,13	1,89e-3	0,12	2,60e-3	0,11	2,93e-3	0,07	0,01
<i>G.graminis</i> 375mM	0,13	0,04	0,11	0,02	0,12	0,06	0,10	0,08

Versuch	L-Ala	±	L-Pro	±	L-Val	±	L-Phe	±
Kontrolle I	0,14	0,03	0,09	0,03	0,12	0,01	0,00	0,00
125mM	0,12	3,18e-3	0,30	0,13	0,08	0,01	0,00	0,00
250mM	0,09	0,01	0,48	4,75e-3	0,07	0,00	0,02	0,03
375mM	0,10	1,55e-3	0,40	0,04	0,07	0,00	0,00	0,00
Kontrolle II	0,13	0,01	0,39	0,03	0,07	4,45e-4	0,10	0,01
<i>Ac.strictum</i> M&S	0,13	0,01	0,20	0,21	0,12	0,01	0,08	0,02
<i>Ac.strictum</i> 125mM	0,26	0,15	0,40	0,06	0,22	0,23	0,04	0,04
<i>Ac.strictum</i> 250mM	0,15	0,08	0,66	0,00	0,07	6,53e-4	0,02	0,03
<i>Ac.strictum</i> 375mM	0,14	0,00	0,71	0,10	0,11	0,00	0,08	0,00
<i>F.culmorum</i> M&S	0,13	0,02	0,25	0,03	0,09	3,28e-3	0,03	0,03
<i>F.culmorum</i> 125mM	0,15	0,05	0,61	0,09	0,41	0,03	0,07	0,02
<i>F.culmorum</i> 250mM	0,13	4,67e-3	0,59	0,00	0,16	0,15	0,08	0,03
<i>F.culmorum</i> 375mM	0,10	0,00	0,17	0,10	0,09	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> M&S	0,14	0,02	0,22	0,05	0,09	2,89e-3	0,07	0,09
<i>M.bolleyi</i> 125mM	0,15	0,07	0,47	0,07	0,31	0,21	0,07	0,01
<i>M.bolleyi</i> 250mM	0,11	0,02	0,59	0,03	0,07	0,01	0,06	0,01
<i>M.bolleyi</i> 375mM	0,10	0,02	0,67	0,04	0,15	0,13	0,06	4,56e-3
<i>G.graminis</i> M&S	0,12	0,01	0,53	0,05	0,10	0,01	0,05	3,68e-3
<i>G.graminis</i> 125mM	0,31	0,21	0,47	0,02	0,40	0,10	0,04	0,03
<i>G.graminis</i> 250mM	0,15	0,01	0,58	0,03	0,33	0,02	0,06	4,37e-3
<i>G.graminis</i> 375mM	0,12	0,04	0,64	0,06	0,26	0,17	0,05	0,04

Noch F. 1

Versuch	L-Ile	±	L-Leu	±	L-Lys	±
Kontrolle I	0,01	0,01	0,03	0,05	0,00	0,00
125mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
250mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
375mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kontrolle II	0,04	0,01	0,08	0,07	0,09	0,08
<i>Ac.strictum</i> M&S	0,04	0,01	0,11	0,02	0,13	0,01
<i>Ac.strictum</i> 125mM	0,02	0,02	0,07	0,06	0,04	0,07
<i>Ac.strictum</i> 250mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,07
<i>Ac.strictum</i> 375mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00
<i>F.culmorum</i> M&S	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04	0,06
<i>F.culmorum</i> 125mM	0,03	0,02	0,08	0,07	0,14	0,02
<i>F.culmorum</i> 250mM	0,01	0,02	0,04	0,07	0,13	1,93e-3
<i>F.culmorum</i> 375mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> M&S	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> 125mM	0,03	0,01	0,11	0,01	0,08	0,07
<i>M.bolleyi</i> 250mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> 375mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,07
<i>G.graminis</i> M&S	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04	0,07
<i>G.graminis</i> 125mM	0,01	0,01	0,00	0,00	0,05	0,09
<i>G.graminis</i> 250mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>G.graminis</i> 375mM	0,00	0,00	0,07	0,06	0,09	0,08

F. 2 Gehalte der freien löslichen Aminosäuren in den Pilzextrakten von *Ac. strictum* und *F. culmorum*

Die Kultivierung der Pilzisolat erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben. L-Asn – L-Asparagin; L-Gln – L-Glutamin; L-Asp – L-Asparaginsäure; L-Ser – L-Serin; L-Glu – L-Glutaminsäure; L-Arg – L-Arginin; L-Thr – L-Threonin; L-Gly – L-Glycin; L-Ala – L-Alanin; L-Pro – L-Prolin; L-Val – L-Valin; L-Phe – L-Phenylalanin; L-Ile – L-Isoleucin; L-Leu – L-Leucin; L-Lys – L-Lysin.

Die Aminosäuregehalte wurden in μM pro g Biotrockenmasse [$\mu\text{M/gBTM}$] angegeben; Tnl –Tage nach Inokulation n = 9; \pm = Standardabweichung.

Tnl	Versuch	L-Asn	\pm	L-Gln	\pm	L-Asp	\pm	L-Ser	\pm
6	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	51,11	17,42	0,83	0,76	0,00	0,00	0,44	0,38
9	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	55,66	33,27	1,21	0,06	0,00	0,00	0,47	0,14
6	<i>Ac. strictum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	0,71	0,66	0,00	0,00	0,14	0,24
3	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	2,03	3,51	0,46	0,13	13,38	11,20	0,21	0,05
6	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	6,44	0,53	0,28	0,13	6,42	0,47	0,11	0,01
9	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	3,58	3,18	0,21	0,06	4,00	6,93	0,06	0,01
3	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	0,22	0,19	0,00	0,00	0,15	0,21
6	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	0,15	0,02	2,86	0,48	0,06	0,02
9	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	1,03	1,78	0,13	0,05	1,15	1,99	0,04	0,02
Tnl	Versuch	L-Glu	\pm	L-Arg	\pm	L-Thr	\pm	L-Gly	\pm
6	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,77	0,67	0,73	1,26	1,50	2,60	1,45	1,87
9	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,83	0,21	0,12	0,22	0,00	0,00	3,65	0,85
6	<i>Ac. strictum</i> 0,75M NaCl	0,57	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	1,81	1,98
3	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,72	0,23	0,27	0,08	0,17	0,05	1,19	0,28
6	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,45	0,14	0,14	0,01	0,15	7,77e-4	0,69	0,24
9	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,36	0,07	0,11	0,03	0,07	0,02	0,41	0,14
3	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,26	0,22	0,12	0,14	0,39	0,35	0,36	0,43
6	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,22	0,06	0,07	0,02	0,09	0,08	0,63	0,22
9	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,20	0,09	0,05	0,02	0,46	0,13	0,09	0,14
Tnl	Versuch	L-Ala	\pm	L-Pro	\pm	L-Val	\pm	L-Phe	\pm
6	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	2,93	2,11	1,92	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00
9	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	1,25	0,51	1,02	0,23	8,25	14,30	0,00	0,00
6	<i>Ac. strictum</i> 0,75M NaCl	0,94	0,86	1,27	1,10	0,00	0,00	0,00	0,00
3	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,39	0,06	0,13	0,02	0,00	0,00	12,90	10,95
6	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,27	0,16	0,10	0,02	0,00	0,00	7,66	1,56
9	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,12	0,03	0,08	0,01	0,00	0,00	5,03	5,12
3	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,20	0,26	0,22	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
6	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,13	0,08	0,05	0,01	0,00	0,00	3,20	0,63
9	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,07	0,04	0,03	0,02	0,00	0,00	4,16	1,89

Noch F. 2

Tn	Versuch	L-Ile	±	L-Leu	±	L-Lys	±
6	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,65
9	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,16
6	<i>Ac. strictum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,35
3	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	0,00	0,00	22,13	19,34	0,45	0,14
6	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	3,89	3,48	10,78	2,13	0,28	0,04
9	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	1,59	2,75	5,64	5,35	0,12	0,03
3	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,76
6	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	3,89	0,39	0,18	0,06
9	<i>F. culmorum</i> 0,75M NaCl	0,00	0,00	4,83	1,44	0,08	0,06

Anhang G Zucker- und Zuckeralkoholgehalte in den pflanzlichen Extrakten von *A. arenaria*

Die *A. arenaria*- Pflanzen wurden entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle) bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl) in Murashige und Skoog (M&S)- Medium gedüngt und / oder mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert und wie unter 2.1.3 kultiviert.

Angabe in mg pro g Biotrockenmasse [mg/gBTM]; n = 9; ± = Standardabweichung

Versuch	D-Saccharose	±	D-Glucose	±	D-Fructose	±
Kontrolle I	0,00	0,00	14,92	0,61	14,75	0,76
125 mM	57,52	23,68	42,03	17,33	45,59	18,48
250 mM	5,43	0,61	30,02	12,04	27,46	14,73
375 mM	3,69	0,00	25,30	9,67	29,01	12,86
Kontrolle II	5,86	0,35	3,57	1,49	3,66	2,06
<i>Ac.strictum</i> M&S	30,43	22,79	25,46	15,19	25,29	14,03
<i>Ac.strictum</i> 125 mM	3,95	1,30	14,12	5,51	15,85	5,77
<i>Ac.strictum</i> 250 mM	0,00	0,00	12,60	4,83	15,84	5,48
<i>Ac.strictum</i> 375 mM	0,00	0,00	6,36	0,05	4,47	0,05
<i>F.culmorum</i> M&S	10,52	5,64	15,88	5,65	15,77	5,81
<i>F.culmorum</i> 125 mM	6,18	0,47	13,60	4,14	13,74	2,23
<i>F.culmorum</i> 250 mM	0,00	0,00	10,62	0,68	7,74	0,66
<i>F.culmorum</i> 375 mM	0,00	0,00	5,46	0,05	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> M&S	5,23	1,40	11,40	4,34	12,68	4,83
<i>M.bolleyi</i> 125 mM	4,19	0,64	12,67	7,18	16,02	10,65
<i>M.bolleyi</i> 250 mM	3,72	0,00	8,31	2,23	11,06	3,85
<i>M.bolleyi</i> 375 mM	0,00	0,00	42,07	49,97	12,68	0,87
<i>G.graminis</i> M&S	0,00	0,00	18,31	0,85	20,11	2,61
<i>G.graminis</i> 125 mM	0,00	0,00	20,98	8,99	23,28	9,30
<i>G.graminis</i> 250 mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>G.graminis</i> 375 mM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Versuch	D-Glycerol	±	D-Mannitol	±
Kontrolle I	0,00	0,00	0,00	0,00
125 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
250 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
375 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
Kontrolle II	0,00	0,00	10,71	2,97
<i>Ac.strictum</i> M&S	8,22	4,69	1,86	1,17
<i>Ac.strictum</i> 125 mM	0,00	0,00	1,73	0,17
<i>Ac.strictum</i> 250 mM	0,00	0,00	1,79	0,15
<i>Ac.strictum</i> 375 mM	0,00	0,00	5,43	0,04
<i>F.culmorum</i> M&S	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>F.culmorum</i> 125 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>F.culmorum</i> 250 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>F.culmorum</i> 375 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> M&S	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> 125 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> 250 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.bolleyi</i> 375 mM	0,00	0,00	5,08	0,27
<i>G.graminis</i> M&S	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>G.graminis</i> 125 mM	0,00	0,00	3,51	0,00
<i>G.graminis</i> 250 mM	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>G.graminis</i> 375 mM	0,00	0,00	0,00	0,00

Anhang H Spezifische Aktivitäten der untersuchten Enzyme

H. 1 Spezifische Aktivität der Ferredoxin abhängigen Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT) von *A. arenaria*

Die *A. arenaria*- Pflanzen wurden entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle) bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl) in Murashige und Skoog (M&S)- Medium gedüngt und / oder mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert und wie unter 2.1.3 kultiviert. Die spezifische Aktivität (sp. Aktivität) der Fd-GOGAT von *A.arenaria* wurde in U/mg angegeben; n = 9; \pm = Standardabweichung

Versuch	sp.Aktivität	\pm	Versuch	sp.Aktivität	\pm
Kontrolle I	1,26	0,14	<i>M.bolleyi</i> M&S	0,97	0,17
125 mM	1,22	0,23	<i>M.bolleyi</i> 125 mM	0,87	0,04
250 mM	1,07	0,13	<i>M.bolleyi</i> 250 mM	1,04	0,08
375 mM	1,27	0,13	<i>M.bolleyi</i> 375 mM	1,06	0,22
Kontrolle II	1,21	0,27	<i>G.graminis</i> M&S	1,08	0,13
<i>Ac.strictum</i> M&S	1,00	0,39	<i>G.graminis</i> 125 mM	1,14	0,23
<i>Ac.strictum</i> 125 mM	0,83	0,43	<i>G.graminis</i> 250 mM	1,17	0,31
<i>Ac.strictum</i> 250 mM	1,28	0,41	<i>G.graminis</i> 375 mM	1,18	0,30
<i>Ac.strictum</i> 375 mM	1,54	0,46			
<i>F.culmorum</i> M&S	1,07	0,23			
<i>F.culmorum</i> 125 mM	1,27	0,27			
<i>F.culmorum</i> 250 mM	1,31	0,19			
<i>F.culmorum</i> 375 mM	2,36	0,00			

H. 2 Spezifische Aktivität der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS) von *A. arenaria*

Die *A. arenaria*- Pflanzen wurden entweder ohne Salzzugabe (Kontrolle) bzw. mit drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (125, 250 und 375 mM NaCl) in Murashige und Skoog (M&S)- Medium gedüngt und / oder mit jeweils einem der Pilzisolat inokuliert und wie unter 2.1.3 kultiviert. Die spezifische Aktivität der P5CS von *A.arenaria* wurde in U/mg angegeben.

n = 9; \pm = Standardabweichung

Versuch	sp.Aktivität	\pm	Versuch	sp.Aktivität	\pm
Kontrolle I	1,00e-3	1,27e-4	<i>M.bolleyi</i> M&S	6,91e-4	6,68e-4
125 mM	1,26e-3	4,65e-4	<i>M.bolleyi</i> 125 mM	1,24e-3	2,56e-4
250 mM	1,40e-3	3,13e-4	<i>M.bolleyi</i> 250 mM	1,03e-3	3,07e-4
375 mM	1,64e-3	6,60e-4	<i>M.bolleyi</i> 375 mM	1,13e-3	5,28e-4
Kontrolle II	5,82e-4	1,78e-4	<i>G.graminis</i> M&S	6,28e-4	3,85e-4
<i>Ac.strictum</i> M&S	6,28e-4	1,06e-4	<i>G.graminis</i> 125 mM	7,94e-4	1,96e-4
<i>Ac.strictum</i> 125 mM	5,75e-4	4,18e-5	<i>G.graminis</i> 250 mM	8,58e-4	8,36e-5
<i>Ac.strictum</i> 250 mM	1,07e-3	3,07e-4	<i>G.graminis</i> 375 mM	5,12e-4	2,70e-4
<i>Ac.strictum</i> 375 mM	5,66e-4	5,51e-4			
<i>F.culmorum</i> M&S	6,69e-4	9,49e-5			
<i>F.culmorum</i> 125 mM	7,89e-4	1,98e-4			
<i>F.culmorum</i> 250 mM	7,21e-4	3,55e-4			
<i>F.culmorum</i> 375 mM	1,36e-4	0,00			

H. 3 Spezifische Aktivität der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS) von den untersuchten Pilzisolaten

Die Kultivierung der Pilzisolat e erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben. Die spezifische Aktivität der P5CS von den untersuchten Pilzisolaten wurde in U/mg angegeben.
sp. Akt = spezifische Aktivität der P5CS, n = 3; \pm = Standardabweichung

TnI	Versuch	sp. Akt	\pm	Versuch	sp. Akt	\pm
3	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	8,20e-7	5,88e-7	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	2,05e-7	2,97e-7
6	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	-4,48e-8	1,35e-7	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	7,62e-7	6,12e-7
9	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	1,21e-8	2,13e-7	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	-3,55e-8	8,90e-9
12	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	1,40e-6	1,48e-6	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	9,44e-8	2,05e-7
15	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	6,99e-8	6,66e-8	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	1,61e-7	8,65e-8
18	<i>Ac. strictum</i> ohne NaCl	1,83e-7	4,11e-8	<i>Ac. strictum</i> 0,75 M NaCl	0,00	0,00
TnI	Versuch	sp. Akt	\pm	Versuch	sp. Akt	\pm
3	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	3,88e-6	4,30e-7	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	7,31e-6	3,56e-6
6	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	1,22e-5	2,41e-6	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	2,29e-5	1,55e-5
9	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	2,20e-5	1,19e-5	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	5,15e-5	5,53e-5
12	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	1,48e-5	3,98e-6	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	1,67e-5	1,26e-5
15	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	2,36e-5	1,37e-5	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	1,39e-5	7,38e-6
18	<i>F. culmorum</i> ohne NaCl	2,12e-5	3,76e-6	<i>F. culmorum</i> 0,75 M NaCl	1,67e-5	7,65e-6

Anhang I Sequenzen

I. 1 Sequenzen der 28S-rRNA-Region von den untersuchten Pilzisolaten

Pilzisolat	Sequenzen der 28S-rRNA-Region
<i>Ac. strictum</i>	<p>TTTCATTACGCGTAGGGGTTTGACACCCG AACTCGCATACGAAGACGACTCCTTGGTC CGTGTTTCAAGACGGGTCATTGATGACCATTACGCCAGCATCCGTGCCGAAGCGCGTTCC TCAGTCCGCCCCAGGGCATTACACGGCGGGCTATAAACTCCCCGAAGAGAGCCACATTC CCACCGCCTTTGTCCCCCGGGGCAAAGTATGCTGGCCTGGACTGGCAGAGTGACCCGGC GAGAACGCCGATGTTCAACCAAGCCCAAGTCTGGTCATGAATGCTTCCCTTTCAACAAT TTCACGTACTTTTAAACCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGT GCGCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGACGTACACCTCCCATTAGAGCA GCATTCCAAAGTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGTGGTCTTACCGT ACGGGGCTCTACCCCTCTATGGCGTCCCGTTCCAGGGAAGTCCGAAAGCACCCGATCAA AGCATCCTCTACAAATTACAAGTGGACCGTGGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGC CGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCKKTSKNNNTNNN</p>
<i>F. culmorum</i>	<p>ACTTTCATTACGCGTAGGGGTTTGACACCCGAACACTCGAKTACGAAGACGACTCCTTGG TCCGTGTTTCAAGACGGGTCGTTGATGACCATTACGCCAGCATCCTTGAGAAGCGCGAA CCTCAGTCCCCACCAGGGTATTACACAACGGGCTATAAACTCCCCGAGGGGAGCCACAT TCCCGAAGTCTTTATCCCCGGCGAAAACTGATGCTGGCCTGGGCTGGAAAAGTGCACTG GAGAGAACCCAGATGATTAACCAAGCCCAAGTCTGGTCATAAACGCTTCCCTTTCAACA ATTTACGTACTTTTAACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTT GTGCGCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGACATATACCTCCCATTAGAG CAGCATTCCAAAGTACTCGACTCGTCGAAGGAGATTTACAGAGATTTGGCATCCAACCA GACGGGGCTCTACCCCTCTATGGCGTCCCGTTCCAGGGAAGTCCGAAAGCACCCGATCAA AATCATCCTCTACAAATTACAAGTGGGCCCCGAAAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTG CCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTSGGBSCNNNNNNNVGNDDCSCDWW DVVVR</p>
<i>M. bolleyi</i>	<p>ATGCACCCGTAAGCNTCTCATCTCCGTTCACTTTTATTACGCTTGAGGGTTTAACACCCA AAAAGTCCGATAAATGTTGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTGGCTGATGACCA TTATGCCAGCATCCTAGCCGAAGCGCGTCTCAGTCCCAGCGGGCTATTACACAGCAG GCTATAAACTCCCGGAGGAGTACATTTCTGAAGTCTTTATCCGGCCGCCAAAAGTAT GCTGGCCTCAACCAAGCGGAGTGACCCGGTGAGAACACCGGATGATCCGCAAGGCCAAAG TCTGGTCATAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTATTTAAACCTCTTTTCAAAG TGCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGCT TTAGAAGAAATTTACCTCCCATTAGAGCAGCATTTCCAAAAGTACTCGACTCGTCGAAGG AGCTTTACAGAGGCTCGGTATCCAATCGTACGGGGCTCTACCCCTCTAAGGCGTCTGT CCAAGGAAGTCCGAAAGGTACCTAACCAAAAAGCATCCTCTACAAATTACAATTCGACCA AAGGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCT GTDGNNNNBNBNS</p>
<i>G. graminis</i>	<p>CTTTCATTACGCGTGCGGGTTTBACACCCAAACACTCGCACTAATGCTTGACTCCTCGGT CCGTGTTTCAAGACGGGTCGCTGATGACCATTACGCCAGCATCCTTGCCGAAGCGCGGTC CTCGGTCCCCGCCGGGTATTAAGCAACGGGCTATAAACTCCCCGAAGAGCCACGTTCC CGAAGCTTTTGTCCCCGGCGAAAACCGATGCTGGCCTGAGCCGGGCGGAGTGACACAGC GAGAACGCTGGATGATCCGCCCGGCGCAAGTCTGGTCACGAGCGCTTCCCTTTCAACAAT TTCACGTGCTATTTAAACCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGT GCGCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCCATTAGAGCA GCATTCCAAAGTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGCGTCTACCAT CGGGGCTCTACCCCTCTGTGGCGCCCCGTTCCAGGGGACTCGGTAAGCGCTTTGCCAAAA GCATCCTCTGCAAAATTACAAGTGGGCGTGGGGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCG CTTCACTCGCCGTTACTANGGCAATCCCTGTTGGTTTBTTHBHBDBDB B</p>

I. 2 Sequenzen der ITS-Region von den untersuchten Pilzisolaten

Pilzisolat	Sequenzen der ITS-Region
<i>Ac. strictum</i>	<p>TCTCCAACCCATTGTGAACCTACCAAACGTTCCCTCGGCGGGCTCAGCGCGCGGTGGCCT CCGGGCCCTCCGGGCGTCCGCCGGGGAAAAACCAACCCTGATTTAATCGTATTTCTCTGAG GGGCGAAAGCCGAAAAACAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGCACTCCGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCG TCATTTCAACCCTCAGGCCACCCCTTCCGGGGGAGCGGGCCTGGTTCTGGGGATCGGCGG CCCTCGCGGCCCGCTCCCTCAAATTCAGTGGCGGTGCGCGCCGAGCCTCCCTGCGTAG TAGCACAACCTCGCACCGGAGAGCGGAACGACCACGCCGTAAACACCCAATTTTAAAG GTTGACCTCGGATCAGGTATKAATACCCGCTGAACCTAAGCATATBAATAAGCGG</p>
<i>F. culmorum</i>	<p>CACCCCTGTGAACATACCTTATSTTGCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAGG ACGGCCCGCCGAGAACCTTAACTCTGTTTTAGTGGAATCTCTGAGTATAAAAAACAA ATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGC CCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTCAAC GTCG AGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACG CCGTAAACCCCACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGA</p>
<i>M. bolleyi</i>	<p>CAAACCATGTGAACCTTACCACTGTTGCCTCGGCGGTGCGGTGCTGGAACAGAGCTGCCAC CGGTGGACTACTAAACCCTTGTTAANTTTGTCAAATCTGAATCAAACTAAGAAATAAGTTA AACTTCCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCA TTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAG TGTTGGGAGACTGCCTAATACGCAGCTCCTCAAAACCAAGTGGCGGAGTCTGTTCTGTG TCCGAGCGTAGTAATTTTATCTCGCTTCTGCAAGCCGGCCAGACGACAGCCATAAACCC GCACCCTCTTGGGGGACCTTTTTAAAGGTTGACCTCGGAGCAGGTAGGAATACCCGCA GAACCTAAGCA</p>
<i>G. graminis</i>	<p>GTCCCCCGGGGTCCGGACGCCGCGGAGGTTACAAACCCCTGAATTTTGTGTATCTC TGAGTACAAAACCAASTAAKTAAAAACSTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC GATGAAGAACGCAGCGAAARTGCGANTAAGTAATGTGAAATTGCAGAATTCAGTGAATCA MTCGAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTCCGA GCGTCATTTCAACCACTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGGCACCCGGCCGCGCGGTGCGG GGGCCCTCAAGAAACATCGGCGGTCTCGCTAGGACCCTGAACGCAGTAACCTCGCGGTAA AACGCGCTTCAGATTCCGGTGGGCTTCCCTKTCGGGCTCCAGCCCGCTAAACCCCCCTAAAC</p>

I. 3 mRNA-Sequenz der putativen Prolinoxidase von *O. sativa*

GenBank accession No.: NM_197664.

Oryza sativa (Kultivar „Japonica“) gi:37536687; gi|37536687:

Putative Prolinoxidase; (OSJNBa0015J15.31); 1428 Basenpaare

```
ATGGCCATCGCCTCCCGCATCCAGAAGCGCGTGTCTTGCCTCCTTCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCCAAAGCTCC
CGGAGGCGGCCGTCGCGGCCGCCGAGGCGCCGAGAGGCGGTGGAGGAGGTTCGCGTCTTCCGTGCAGGA
GCAGGTGCAGGCGCAGGGAGCGCAGGTGTTGGAGTTTGGGGATACCGAGAGGCTGTTCCGCCGGGAGAGG
TCGACGTCGCTGGTGCGCACGCTCGCCGTGCTGCAGGCGCTGTCGGTGGGCCCGCTCGTGGACGTGGCGA
CGGCGGCGCTGAGGTGCGCGGCGGTGGCCGGGAGCGCGGCGGGGCGCGCCGCCGCGGAGGGCCACCGCGTA
CCAGCACTTCTGCGCCGGGGAGACCGCCGAGGAGGCCGCCGCCGCCGCGGTGCGCCGCCCTCTGGCGCGGCGGC
ATGGGCGGGATCCTCGACTACGGCATCGAGGACGCCGAGGACGGCCCCGCCCTGCGACCGCAACGCCGCCG
GATTCCTCGCCGCCATCGACGTCGCCGCCGCGCTGCCTCCTGGCTCGGCGAGCGTGTGCATCAAGATCAC
GGCGCTGTGCCCGGTGCGGTTGCTGGAGAAGGCGAGTGATCTGCTGCGGTGGCAGCAGAAGCACCCGGCG
ACGAAGCTGCCATGAAAGTGCACGGGTTCCCGGTGCTGTGCGTCTCCAGCCCGCTGTACCTGACCGCGG
CGGAGCCGCGGCGCTGGAGGCGGAGGAGGAGGAGGAGCTCGAGATGGCGCACGGGCGGCTGCTGGCGAT
CGGCGAGCGGTGCGCGGAGTACGACATCCCGCTGCTGGTGGACGCCGAGTACGCCACCGTGCAGCCGGCG
ATCGACTACTTCACGTTCCGCCGGCGCGCTGGCGTTCAACGGCGGCGGGAGGCCCATCGTGCACGGCACCG
TCCAGGCCTACCTCCGCGACGCGCGCGACCGGCTGGAGGCCATGGCGCGAGCGGCGCAGGGCGAGCGCGT
GTGCTCGCGCTCAAGCTGGTCCGCGGCGCGTACCTGGCGCGCGAGGCCCGCCTCGCGGCCCTCCCTCGGC
GTGCCGTGCGCGGTCCACCGCAGCATCCAGGACACCCACGACTGCTACAACGGCTGCGCCGCGTTCCTCC
TCGACCGCGTCCGCCGCGGCGGCCGCCCGCTGACGCTCGCCACGCACAACGTCGAGTCCCGGCAGCTCGC
CGCGGCGAGGGCGCTGGAGCTCGGCATCGGCGGCGGCGGCGACCGCGGCTGCAGTTCCGCGCAGCTGATG
GGCATGGCGGATGGCCTCGCTCGGCTCCGCAACGCCGGGTTCCAGGTGAGCAAGTACCTGCCGTACG
GTCCAGTGGAGCAGATCATCCCGTACCTCATCAGACGAGCAGAGGAGAACAGGGGATTGCTCTCGTCTTC
CTCCTTCGACAGACAGCTGCTCCGGTAA
```

I. 4 Proteinsequenz der putativen Prolinoxidase von *O. sativa*

GenBank accession No.: NP_922646.

Putative Prolinoxidase [gi:37536688] gi|37536688|ref|NP_922646.1|

Oryza sativa (Kultivar „Japonica“); 475 Aminosäuren

```
MAIASRIQKRVLASFAAAAAAKLPEAAVAAAGGAAEAVEEVASSVQEQVQAQGAQVLEFGDTERLFAGER
STSLVRTLAVLQALSVPGLVDVATAALRSPAVAGSAAGRAAARATAYQHFCAGETAEEAAAAVRRLWRGG
MGGILDYGIEDAEDGPACDRNAAGFLAAIDVAAALPPGSASVCIKITALCPVALLEKASDLLRWQKHPA
TKLPWKVHGFVPLCVSSPLYLTAAEPPALEAEERELEMAHGRLLAIGERCAEYDIPLLVDAEYATVQPA
IDYFTFAGALAFNGGGRPIVHGTQAYLRDARDREAMARAAQGERVCLALKLVRGAYLAREARLAASLG
VPSPVHRISQDTHDCYNGCAAFLLDRVRRGAAAVTLATHNVESQLAAARALELGIGGGGDRGLQFAQLM
GMADGLSLGLRNAGFQVSKYLPYGPVEQIIPYLIRRAEENRGLSSSSSFDRLLR
```

I. 5 Sequenzen von pflanzlichen EST's, die bei der Konstruktion von den spezifischen Primern zur Amplifikation der Prolindehydrogenase von *A. arenaria* (*AaPDH*) verwendet wurden

Pflanzenart	GenBank accession No.	EST's - Sequenz
<i>Triticum aestivum</i>	CD930394	GACTACTTCACCTTCGTGGGCGCGCTGGCGTGCAACGGCGGGCGGGCGACCCA TCGTGCACGGCACCGTCCAGGCGTACCTCCGCGACGCGCGACCGGCTGGA GGCCATGGTGCGCGCGGCCGAGGAGGAGCGCGTGTGCCTCGGGGTCAAGAT CGTCCGCGGGCGCCTACCTACCCGGGAGGCCCGGCTGGCGGAGTCCCTGGG CGTGCCGTGCGCCATCCACGGCAGCATCCAGGACACCCACGACTGCTACAAC GGCTGCGCGGCCCTTCCTCTGGAGCGCGTCCGCCGCGGGTCGGCGTCCGTG ATGCTGGCCACCCACAACGTGGAGTCCGGGCAGCTGGCGGCGGCGAGGGCG CAGGAGCTGGGCATCGGCAAGGGCGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCAGCTGA TGGGCATGGCGGACGGGCTGTCCCTGGGGCTCCGCAACGCGGGGTTCCAGG TGAGCAAGTACCTGCCCTACGGCCCCGTGGAGCACATCATCCCCTACCTCATC CGGCGGGCCGAGGAGAACAGAGGACTGCTCTCCGCTTCCGCCTTCGACCGGC AGCTGCTCCGGAAGGAGCTCGTCAGGAGGTTCAAGAACGCGGTGATGGGACG GGAGTGAGGAGGCCGCGGGAGGTTACGTACGGGAGAGAGACGACGAGATT AGGAGTTGTAATATGCATGGTGGATCGGGACCTGAATGAATGAATAACGAAAT AACGCTGTGCAATCGC
<i>Triticum aestivum</i>	CD913221	ATTCGTTTATTTCAATCAGGTCGCGATACAACAATGCATATTTACAATTCTAAC TCCGTGCGTTCTCTCCCGTGAACCTCCCGTCGGCCATCTCACTCCCGTCCCAC CACCGCGTTCTTGAACCTCCTAACAGCTCCTTCCGGAGCAGCTGCCGGTCGA AGGCGGAAGCGGAGAGCAGTCTCTGTTCTCCTCGGCCCGCCTGATGAGGTA GGGGATGATGTGCTCCACGGGGCCGTAGGGCAGGTAAGTCTGCTACCTGGAAA CCGGCGTTGCGGAGCCCCAGGGACAGCCCGTCGGCCATGCCCATCAGCTGCG CGAACTGCAGGTTCCGGTCGCCCTTGCCGATGCCAGCTCCTGCGCCCTCGC CGCCGCCAGCTGCCCGGACTCCACGTTGTGGGTGGCCAGCATCACGGACGCC GACCCGCGGGCGGACGCGCTCCAGGAGGAAGGCCGCGCAGCCGTTGTAGCAG TCGTGGGTGTCTGGATGCTGCCGTGGATGGGCGACGGCAGCCACGCGACT CCGCCAGCCGGGCTCCCTGGTGAGGTAGGCGCCGCGGACGATCTTGACCCC GAGGCACACGCGCTCCTCCTCGGCCGCGCGCACCATGGCCTCCAGCCGGTCG CGCGCGTGCGGGAGGTACGCCTGGACGGTGCCGTGCACGATAGGCCGCCCG CCGCCGTTGCACGCCAGCGCGCCACCGAACGTGAAGTAGTCGATGGACGGG TGTACCGACGCGTACTCGCGGACGCGTGG
<i>Triticum aestivum</i>	CD881169	ACCAGCAGGTCTGGAGTTTGGAGACACCGAGAGGCTCTTACCGGGGAGCC GTCCACGGCTCTGGTGCGCACGCTCGCGGCGCTGCAGTTGATGTCCGCGGGC CCGCTGGTGACGTGGGCTCGCGGCGCTGCGGTCTCCGGCGGTGGCCGCC AGCCCCGTGGTCCAGGCCGCGGCGCGGGCCACGGCGTACAAGCACTTCTGG CCGGGGAGACCGCCGATGAGGCCGCGGCCCGGGTGCAGCGCCTCTGGCGCG GCGGCATGGGCGGGATCCTCGACTACGGCATCGAGGACGCCGAGGACGGCG CCGCCTGCGACCGCAACGTGCGCGGCTTCTCGCCGCGCTGACGTGCGCCG CGCGCTGCCGCGGGATCGGCGAGCGTGTGTATCAAGATCACGGCGGTGTG CCGATCGCGTTGCTGGAGAAGACGAGCGACCTGCTGCGGTGGCAGCACAGA ACCCGTGCGGTGCACCTGCCGTGGAAGCAGCACGCCTTCCCGATCCTGTCCGA CTCGAGCCCGCTGTACCTGACGCCGTGCGAGCCGGCGGCGCTGACGGCGGA GGAGGAGCACGAGCTGCAGCTGGCGCACGACCGGCTGCTGGCCGTGGCGCG GCGGTGCGCGGAGCACGACATCCCGCTGCTGGTGGACGCCGAGTACGCGTC GGTGACGCCGTCCATCGACTACTT
<i>Zea mays</i>	CO525802	GCCGCGCACGACCTTGAGCCCCAGGCGCACGCGCTCCCGCTCCGCGCCGCG CACCATGGCCTCCAGCCGGTCCCGCGCGTCCGCGGAGGTACGCCTGGATGGTG CCGTGCACGATGGGTGCGCCCGCGTCCGCCGCGCCGGCGTCTTGAACGCCA GCGCGCCACACAGCGTGAAGTAGTCGATGGCCGGCTGCACCGTCGCGTACTC CGCGTCCACAGCAGCGGGATGCCGTGCTCCGCGCACCGCGCGCACACCGC CAGCAGCCGCGAGTGCGCCAGCTGCAGTCCCTCTCCTCCCTCCGCGCGTCA GCCGCCGGCTCCGACGCGGTGAGGTGGAGCGGGCTCGAGTCAGACAGCACC GGGAAGGAGTGCGTCTTCCACGGCAGGCTGAACGACGGGTGCTTCTTCTGCC AACGCAGCAGGTGCTCGCTTCTCCAGCAGCGCGATCGGGCAGAGCGCCGT GATCTTGATGCACACAGTCCCGGAGCCCGGAGGCGAGCGAGCTCG ACGGCGGAGACGAACCCGGCGGCGTTCGGGTGCGAGCGGTGGCCGTCTCTC CGTCTCGATCCCGTAGTCGAGGATCCCGCCCATGCCCGCGCGCAGA

Noch I. 5

Pflanzenart	GenBank accession No.	EST's - Sequenz
<i>Zea mays</i>	CO533394	GACCCGGGCTCGCGGGCCAGGTACGCGCCGCGCACCAGCTTGACCCCCAG GCGCACGCGCGCGCTCCACGCCGCGCGCCATGGTCTCCAGCCGCTCCCG CGCGTCGCGTAGGTACGCCTGGACCGTGCCGTGCACGATGGAGCGCTCGGCG TTGCACGCCAGCGCGCCGCGGAGCGTGAGGTAGTCGATCGCCGGCTGCACCG CCGCGTACTCCGCGTCCACCAGCAGCGGCACGCCGCGCTCCGCGCACCCGCG CGCACACCGCCAGCACCCGCTCGTGCGCCAGCTCCAGCTCCCTCTCTCTCCTC CGCCGACAGCGCCGCGGGCTCCGACGCCGTGAGGTGCAGCGGGCTCGAGTC CGACAGGATCGGGAAGTCGTGCGTCTTCCACGGCAGGTTACGCGACGGGTGC CTCTTCTGCCACCGCAGCAGGTGCTCGCCTTCTCCAGCAGCGCGATCGGGC ACAGCGCCGTGATCTTGATGCACACGCTCGCCGAGCCCGAGGCGAGCTTGCG GGCGACGTGACGCGCGGAGGCGAACC CGCGGGCGTTACGGTCGCGACGCGCC GCCGTCCTCGGCGTCTCGATCCCGTAGTCGAGGATCCCGCCATGCCGCCG CGCCACAGCCGGCGCACGGCCGCCGCGGCTCGCCGGCGGTCTCGCCCGCG CAGAAGTGCCGGTACGCCGTGGCCCTGGCGGCGGCCCGGCCAGCGCGCTG CCGGCCACCGCCGGCGACCGCAGCGCCGAGTGCCGCGTCCACCAGCGGG CCACGACAGCGCCTGCAGCGCGG
<i>Zea mays</i>	CO525803	CGTGCGCCGCTCTGGCGCGGGGGCATGGGCGGGATCCTCGACTACGGGAT CGAGGACGCGGAGGACGGCCACGCTGCGACCGCAACGCCCGGGTTTCGT CTCCGCCGTGACGTCGCCGCTCGCTGCCTCCGGGCTCGGCGAGCGTGTC ATCAAGATCACGCGCTCTGCCCAGTCGCGCTGCTGGAGAAGGCGAGCGACC TGCTGCGTTGGCAGAAGAAGCACCCGTCGTTACGCTGCCGTGGAAGACGCA CTCCTTCCCGGTGCTGTCTGACTCGAGCCCGCTCCACCTGACCGCGTCGGAG CCGGCGCGCTGACGCGGAGGAGGAGAGGAGCTGACGTCGCGGCGACTCG CGGCTGCTGGCGGTGTGCGCGCGGTGCGCGGAGCACGGCATCCCGCTGCTG GTGGACGCGGAGTACGCGACGGTGACGCCGCCATCGACTACTTCACGCTGG TGGGCGCGCTGGCGTTCAACGACGCCGGCGCGGCGGACGGCGGGCGACCCA TCGTGCACGGCACCATCCAGGCGTACCTCCGCGACGCGCGGACCGGCTGGA GGCCATGGTGCGCGGCGCGGAGCGGGAGCGCGTGCCT
<i>Zea mays</i>	CD573092	TGGGAGCTGCAGCTGGCGCACTCGCGGCTGCTGGCGGTGTGCGCGCGGTGC GCGGAGCACGGCATCCCGCTGCTGGTGACGCGGAGTACGCGACGGTGACG CCGCCCATCGACTACTTCACGCTGGTGCGCGCGCTGGCGTTCAACGACGCCG GCGCGGCGGACGCGCGGGCGACCCATCGTGACGGCACCATCCAGGCGTACC TCCGCGACGCGCGGGACCGGCTGGAGGCCATGGTGCGCGCGCGCGGAGCGG GAGCGCGTGCGCCTGGGGCTCAAGGTGCTGCGCGGCGCGTACCTGACCCGC GAGGCCCGGCTCGCGGCCGCGCTCGGCGTGCCGTCGCCGTGACCGGACG ATCCAGGAGACCCACGACTGCTACAACGGCTGCGCCGCTTCTCCTCGACCG CGTGCGCCGCGGGTCCGCCTCCGTATGCTCGCCACCCACAACGTGGAGTCA GGCCAACTCGCGGCGGCGCGTGCCAGGAGCTGGGGATCCCCAAGGGAGAC CGCAACTGCAATTGCGCGAGCTGATGGGCATGGCGGACGGGCTGTCGCTGA GCCTCCGCAACGCCGGT
<i>Hordeum vulgare</i>	BQ765484	GTGCAACGGCGGCGGGCGGCCATCGTGACGGCACCGTGACGGCGTACCT CCGCGACGCGCGCGACCGGCTGGACGCCATGGTGCGCGCCGCCGAGGAGGA GCGCGTGTGCCTCGGCGTCAAGATCGTCCGCGGAGCTACCTACCCAGGGAG GCCCGGCTGGCGGAGTCGCTGGGCGTGCCGTGCGCGATCCACGGCAGCATC CAGGACACCCACGACTGCTACAACGGCTGCGCGGCCCTTCTCCTGGAGCGCG TCCGCCGCGGGTCCGGCTCCGTGATGCTGGCCACCCACAACGTGGAGTCCGG GCAGCTGGCGGCGGCGAGGGCGCAGGAGCTTGGCATCGGCAAGGGCGACCG GAACCTGCAGTTCGCGCAGCTGATGGGCATGGCGGACGGGCTGTCCCTGGGG CTCCGCAACGCCGGTTCCAGGTGAGCAAGTACCTGCCCTACGGCCCCGTGG AGCATATATCCCTACCTCATCCGCGGGGCCGAGGAGAACAGAGGAGTGTCT CTCCGCTTCCGCGTTCGACAGGCAAGTGTCCGGAAGGAGCTCGTCAGGAGG TTCAAGAACGCGGTGATGGGACGGGAGTGAAGCGGGCGGCCGCGGCCGCGG GTGTCCACGTACCGG

Noch I. 5

Pflanzenart	GenBank accession No.	EST's - Sequenz
<i>Hordeum vulgare</i>	CN136042	CATCCTGGAGAAGACGAGCGACCTGCTTCGGTGGCAGAAGAAGCACCCATCGT TCAACCTGCCATGGAAGACGCACTCGTTCCTCGATCCTGTCTGACTCGAGCCCG CTCCACCTGACCCCGTCGGAGCCGCTGCGCTGACGTGCGAGGAGGAGACGG AGCTGCAGCTGGCGCACGAGCGTCTGCTGGCGGTGTGCGCGCGGTGCGCGG AGCACGGCATCCCGCTGCTGGTGGACGCGGAGTACGCGACGGTGCAGCCGG CCATCGACTACTTCACCTTCGTGGGCGCGCTGCGCTTCAACGACGGCGCCGG CGCCGGCGACTGCGAGCAGCGGTCCATCGTGACGGCACCATCCAGGCGTAC CTCCGCGACGCGCGGGACCGGTGGAGGCCATGGTGCGGTCGGCGGAGCGT GAGCGGGTGGCGGTGGGGCTCAAGGTGGTGCAGCGGCGCGTACCTGGCCCGC GAGACCAGGCTCGCGGCGACGCTCGCGTGCCGTGCGCGATCCACGCGCAGC ATCCAGGAGACCCACGACTGCTACAACGGCTGCGCGGGTTTCTCCTGGACC GCGTCCGCCGGGGCACCGCTCCGTGATGCTGCCACCCACAACGTGGAGTC CGGGAAGCTGGCGGCGGCGCGCGCAGGAGCTCGGGATCCCCAGGGGAGA CCGGAACCTGCAGTTCGCGCAGCTGATGGCATGGCGGACGGGCTGT

I. 6 Sequenzen der Klone, die einen Fragment der Prolindehydrogenase von *A. arenaria* repräsentieren

Klon-Nummer	Klonsequenz
1	GTGCTGGAATTCCAGGAGACCCACGACTGCTACAACGGVVGCGCCGCCTT CCTCCTGGAGCGCGTCCGCCTCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTTGCCACCC ACAACGTGGAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGCGAGGGCGCAGGAGCTGGG ATCGGCAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCACTGATGGGCATGGCT GACGGGCTTTCCCTGAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCCAGGTAGCAAGAA GCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATC TAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTAAGTGGCCG TCGTTTTACAACGYCGTGAAGTGGAA
2	TGCTGGAATTCGGCTTCGGAACCCACGACTGCTACASKNGCTGCGCGCCT TCCTCCTGGAGCGCGTCCGCCTCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTTGCCACC CACAACGTGAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGCGAGGGCGCAGGAGCTGGG ATCGGCAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCACTGATGGGCATGGCT GACGGGCTTTCCCTGAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCCAGGTGAGCAAGTA CAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGC ATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTAAGTGG CCGTCGTTTTACAACGTGCTGACTG
6	GTKGTGCTG GAATTCGGCTTCAGGGACCCACGACTGTTAVMMCGGCTG CGCGCCTTCCTCCTGGAGCGCGTCCGCCGCGGGTCCGCCTCCCTGATGCT CGCCACCCACAACGTGAGTCGGGCCAGCTCGCGGTGGCGAGGGCGCAGGA GTTGGGCATCGGCAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCACTGATGGG CATGGCTGATGGGCTGTCCCTGGGCCCTCCGAAACGCCGGGTTCCAGKTGA GCAAGTACAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCG AGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAAT TCACTGGCCGCTCGTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAA
7	GTGCTGGAATTCGGCTTCAGGGAGACCCACGACTGMTATMACGGCTGCGC GCCTTCCTCCTGGAGCGCGTCCGCCTCGGGTCCGCCTCCCTGATGCTTGC CACCCACAACGTGAGTCGGGCCAGCTCGCGGCCGCGAGGGCGCAGGAGCT GGGCATCGGCAAGGGGGACCGGAACCTGCAGTTCGCGCACTGATGGGCAT GGCTGACGGGCTTTCCCTGAGCCTCCGCAACGCCGGGTTCCAGGTGAGCA AGTACAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGC ATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTA CTGGCCGCTCGTTTTACAACGTGCTGACTGGGA

I. 7 Sequenzen der pflanzlichen β -Tubuline, die bei der Konstruktion von spezifischen Primern zur Amplifikation des β -Tubulins von *A. arenaria* eingesetzt wurden

Pflanzenart und GenBank accession No.	β -Tubulin- Sequenz
<i>Oryza sativa</i> AB104732	AAGAACACACACTCTCCCATCCCAACCTCTCCCAAAATTAGCCCCGATCCGATCGCTTCTAGCC CTGATTTCGAGGTAAAAAGGGGAGGAGAAGATGAGGGAGATCTTGACATCCAGGGCGGGCAGTGC GGGAACAGATCGGGTCCAAGTTCTGGGAGGTGGTGTGCGACGAGCATGGCATCGACCCGACGGG GAGGTACGCCGGCACGTTCGACCTGCAGCTGGAGCGCGTGAACGTCTACTACAACGAGGCGTCTGT GCGGCCGGTTCGTGCCGCGCGCCGTGCTCATGGACCTGGAGCCGGGCACCATGGACTCCGTCCGC ACGGGGCCCTACGGCCAGATCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAAC AACTGGGCCAAGGGCCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTCTCGACGTCTGTCGG CAAGGAGGCCGAGAATTGCGACTGCCTCCAAGGTTTCCAGGTGTGCCACTCGCTGGGCGCGCGCA CGGGCTCCGGCATGGGCACCCCTGCTGATCTCCAAGATCAGGGAGGAGTACCCGGACAGGATGATG CTCACCTTCTCCGTGTTCCCGTCGCCCAAGGTGTCGGACACCGTGGTGAGCCCTACAACGCCACG CTCTCGGTCCACCAGCTCGTGGAGAACGCCGACGAGTGCATGGTGTCTGACAACGAGGCGCTCTAT GACATCTGCTTCCGCACCCCTCAAGCTGACGACTCCCAGCTTTGGTGTCTGAACCACTTGATTAGTG CCACCATGAGCGGTGTACCTGCTGCCTGCGCTTCCAGGGCAGCTGAACCTCCGACCTCCGCAAGC TCGCCGTCAACCTGATCCCCTTCCCGCGGCTCCACTTCTTATGGTGGGCTTCGCGCCGCTCACCTC ACGCGGCTCGCAGCAGTACCGCGCCCTCACTGTCCCTGAGCTACCCAGCAGATGTGGGACGCCAA GAACATGATGTGCGCCGCCGACCCGCGCCACGGCCGCTACCTGACGGCCTCGGCCATGTTCCGCG GCAAGATGAGCACCAAGGAGGTGGACGAGCAGATGATCAACGTGCAGAACAAAGAACTCGTCTACT TCGTGGAGTGGATCCCCAACACGTCAAGTCGAGCGTGTGTGACATCCCGCCGCGCGCCCTCTCCA TGCGCTCTACGTTTCGTCCGCAACTCCACCTCCATCCAGGAGATGTTCCGCCGCGTCAAGCAGCAGT TCACGGCCATGTTTCAGGAGGAAGGCGTTCTTGCCTGGTACACGGGCGAGGGCATGGACGAGATGG AGTTACCGAGGCGGAGAGCAACATGAACGACCTCGTCTCCGAGTACCAGCAGTATCAGGACGCCA CCGCCGACGAGGCCGAGTACGAGGAAGAAGAGGACGCGATACAGGAGTAGAGACTGTCTGGGCAA TGGTACCTCGTATCCCCTGCCCATCGTTACCC
<i>Oryza sativa</i> L33263	CCCCCTACACACTCCACCCACGTACAAGCCACAACCGAAGCCGACTCCCACTCCCACTCCCTACACT CCCACGCCATCTCCAACGCCGCCCTCCTCCTCTCCTCAACCCACCCACCTCGCCGCCGCCGCC GTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCATGAGGGAGATCCTGCACATCCAGGGGGGCCAATGCGGGAACAA GATCGGGGGCCAAGTTCTGGGAGGTGATCTGCGACGACGAGGATCGACCACACCGGCAAGTACTC CGGCGACTCCGACCTCCAGCTCGTGGGATCAACGTCTACTACAACAACGAGGCCAGCGGCGGTCTG CTACGTGCCCCGCGCCGTGCTCATGGACCTCGAGCCCGGCCACCACTGACTCCGTCCGCTCCGGCC CCTATGGCCAGATCTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGGG CCAAGGGCCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTCTCGACGTCTCCGCAAGGAG GCCGAGAACTGCGACTGCCTCCAAGGTTTCCAGGTTTGGCACTCGCTGGGCGGAGGAAGTGGCTCC GGGATGGGCACCCCTGCTCATCTCCAAGATCAGGGAGGAGTACCCTGACCGGATGATGCTCACGTTT TCGGTCTTCCCATCGCCCAAGGTGTACGACACTGTCTGCGAGCCCTACAATGCTACCCCTTTGTACCC AGCTTGTGCGAAGTGGGATGAGTGCATGTTTCGTGACAATGAGGCTCTTACGACATGTGCTTCCG CACGCTCAAGCTCGCGACACCTACTTTCGGTGATCTCAACCATCTTATCTCTGCAACAATGAGTGGTG TTACCTGCTGCCTCCGCTTCCCTGGCCAGTTGAACCTGTGACCTCCGGAAGCTTGTGTCAACCTGAT CCCTTTCCCGCGGCTCCACTTCTTATGTTGGATTGCTCTCTGACTTCCAGGGGATCCAGCAG TACCGTGCCCTCACTGTACAGAGCTGACCCAGCAGATGTGGGATGCAAGAACATGATGTGTGCTG CTGACCCCGCCATGGGCGCTACCTCACAGCCTCAGCCATGTTCCGCGGAAAGATGAGCACCAGG AAGTTGATGAGCAGATGCTGAATGTCCAGAACAAAGAACTCGTCATACTTTGTGGAGTGGATCCCTAAC AATGTCAAGTCGAGTGTGTGTGACATTCCACCCATTGGCCTGAAGATGGCATCCACATTCATCGGCA ACTCGACCTCAATCCAGGAGATGTGGAAGGCTTCTTGCCTGGTACACTGGTGAGGGAATGGACGA GATGGAGTTTACCGAGGCTGAGAGCAACATGAACGACCCTGGCCTGGTAGCTGAATACCAAGCAGTA CCAGGATGCCACCGCTGAGGAAGAGGACTATGAGGAGGAAGAGGAGGACGAGGAGTTGCTGCCT AAGCCACCTCTCTGCATGTTTGAGCTATATAGATATCCCTTGTGACATTTGCTACTACTAGTTACCATC GTTGATTGGGGGTGCTTGTAGATGCTAGGTTAATGTTATTATTTCCAAATACTATGTTGCCTTGTGCG ACTATTTTATCTGGGTTAATGGTATGTTCAACATTATTGTCTTGAGGTGGATT

Noch 1. 7

Pflanzenart und GenBank accession No.	β-Tubulin- Sequenz
Oryza sativa X79367	AACTAAACCTCGCCGGAATCCAACCCCTCCGCCGCCGCGCCATGAGGGAGATCCTGCACATCCAGGGG GGGCAATGCGGGAACCAAGATCGGGGCCAAGTTCTGGGAGGTGATCTGCGACGAGCAGGGGATCGA CCACACCGGCAAGTACTCGGGCGACTCCGACCTCCAGCTCGAGCGGATCAACGTCTACTACAACGA GGCCAGCGGCGGCAGGTTCTGTTCCGCGCGCCGTGCTCATGGACCTCGAGCCGGGCACCATGGACT CGGTGCGCTCCGGTCCCTTTCGGCCAGATCTTCCGCCCCGACAATTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCG CCGGCAACAACCTGGGCCAAGGGGCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTCCTCGAC GTCGTCCGCAAGGAGGCGCGGAGAACTGCGACTGCCTCCAAGGATTTCAAGCTGCCACTCTCTAGGA GGAGGAACTGGTTCTGGTATGGGTACCCTGCTCATCTCAATGATCAGGGAGGAGTACCCGGACAGG ATGATGTTGACATTCTCAGTTTTCCCTCACCAGGTTTCTGATACCGTGGTGGAACCTTACAATGC CACACTATCTGTCCATCAGCTTGTGAGAATGCCGATGAGTGCATGGTACTTGACAATGAAGCTCTAT ATGACATCTGCTTCCGCACTCTGAAGCTCGCCACACCCACTTTTGGTGATCTGAACCATCTTATTCT GCAACCATGAGTGGTGTACATGCTGCCTGCGCTTCCCGGACAGCTGAACTCTGACCTCCGCAAG CTGGCGGTTAACTTGATCCCTTCCCTCGTCTCCATTTCTCATGGTCCGGCTTTCACCGCTGACCTC GAGGGGATCCCAGCAGTACCGCGCCCTCACTGTCCCGGAGCTGACCCAGCAGATGTGGGACGCCA AGAACATGATGTGCGCCGCGGACCCAGGCACGGACGCTACCTCAGGAGGATGTTCCGCGG GGAAGATGAGCACCAGGAGGTGGACGAGCAGATGCTCAACGTCCAGAACGAAGTCTGCTCTACT TCGTGGAGTGGATCCCGAACACGTGAAGTGCAGCGTGTGCGACATCCCTCCCAACGGCCTGAAGA TGGCGTCCACCTTATCGGCAACTCGACGTCGATCCAGGAGATGTTCCGCCGCGTGAGCGAGCAGT TCACGGCCATGTTTCCAGGAGGAAGGCTTCTTGCACTGGTACACCGGGGAGGGGATGGACGAGATGG AGTTTACCGAGGCGGAGAGCAACATGAACGACCTGGTGGCCGAGTACCAGCAGTACCAGGACGCGA CAGCCGACGACGAGGAAGAGGACTACGGCGACGAGGAGGAAGACGAGGTTGCTGCCTAAGCCACC TACCTGCCTGCCATTCTCTCGCTCTCGTCATCCATCGTAGATGATGATTGAGGATGTGCTCCCTTGT GTTATTATTACCTAGTACTGTATTGCAACTGTCGATCTGGGTCGTAAGATGTTTATTTAGGTGATTTG ATGCTCTAGTTACTCTTTTTTTTCCCTTGTGTTGATTAAATGGTGTGTTGTCGATGCGAATTGTGATACTA GCTTTAACTGTGGACTTAAATTACTAGATCCTGGAATTGATACTGTTTGCCAGTAAAAAAAAAAAAAA TTGCGGCCGC
Oryza sativa D30717	AAATCCTCCTCCCTCCCTCCCTAAACCTCGCCGGAATCCAACCCCTCCGCCGCCGCGCCATGAGGGA GATCCTGCACATCCAGGGGGGGCAATGCGGGAACCAAGTCTGGGAGGTGATCTGCGACGAGCAGGGATCGA GCGACGAGCAGGGATCGACCACACCGGCAAGTACTCGGGCGACTCCGACCTCCAGCTCGAGCGG ATCAACGTCTACTACAACGAGGCCAGCGGCGGCAGGTTCTGTTCCGCGCGCCGTGCTCATGGACCTC GAGCCGGGACCATGGACTCGGTGCGCTCCGGTCCCTTCCGCCAGATCTTCCGCCCCGACAATTC GTCTTCGGCCAGTCCGGCGCGGCAACAACCTGGGCAAGGGGCACTACACCGAGGGCGCCGAGCT CATCGACTCCGTCTCGACGTCGTCCGCAAGGAGGCGGAGAACTGCGACTGCCTCCAAGGATTTCA AGTCTGCCACTCTCTAGGAGGAGGAAGTGGTTCTGGTATGGGTACCCTGCTCATCTCAAAGATCAGG GAGGAGTACCCGGACAGGATGATGTTGACATTCTCAGTTTTCCCTCACCAGGTTTCTGATACCGT GGTGGAACCTTACAATGCCACACTATCTGCCATCAGCTTGTGAGAATGCCGATGAGTGCATGGTA CTTGACAATGAAGCTCTATATGACATCTGCTTCCGCACTCTGAAGCTCGCCACACCCACTTTTGGTGA TCTGAACCATCTTATTTCTGCAACCATGAGTGGTGTACATGCTGCCTGCGCTTCCCGGGACAGCTG AACTCTGACCTCCGCAAGCTGGCGGTTAACTTGATCCCTTCCCTCGTCTCCATTTCTCATGGTCCG CTTTGCACCGCTGACCTCGAGGGGATCCCAGCAGTACCGCGCCCTCACTGTCCCGGAGCTGACCCA GCAGATGTGGGACGCCAAGAATGATGTGCGCCGCCGACCCAGGCACGGACGCTACCTCACGG CGTCAGCCATGTTCCGCGGGAAGATGAGCACCAGGAGGTGGACGAGCAGATGCTCAACGTCCAGA ACAAGAACTCGTCTACTTCGTGGAGTGGATCCCGAACACGTGAAGTCGAGCGGTGTGCGACATCCC TCCCAACGGCCTGAAGATGGCGTCCACCTTCATCGGCAACTCGACGTCGATCCAGGAGATGTTCCG CCGCGTGAGCGAGCAGTTACCGGCCATGTTTCCAGGAGGAAGGCTTCTTGCACTGGTACACCGGGGA GGGGATGGACGAGATGGAGTTACCGAGGCCGAGAGCAACATGAACGACCTGGTGGCCGAGTACC AGCAGTACCAGGACGCGACAGCCGACGAGGAAGAGGACTACGGCGACGAGGAGGAAGACGAG GTTGCTGCCTAAGCCACCTACCTGCCTGCCATTCTCTCGCTCTCGTCATCCATCGTAGATGATGATT GAGGATGTGCTCCCTTGTGTTATTATTACTAGTACTGTATTGCAACTGTCGATCTGGGTCGTAAGAT GTTTATTTAGGTGATTTGATGCTCTAGTTACTCTTTTTTTTCCCTTGTGTTGATTAAATGGTGTGTTGTCG ATGCGAATTGTGATACTAGCTTTAACTGTGGACTTAAATTACTAGATCCTGGAATTGATACTGTTTGCC AGT

Noch 1. 7

Pflanzenart und GenBank accession No.	β -Tubulin- Sequenz
<i>Triticum aestivum</i> U76895	GCCGAATCCCCACCTCCACCCCTCCCCGCAACCACCACCACCACCGTCCACCGGACCACCGTC ACCGGCGGGGGCGAAGGCACGATGAGGGAGATCCTGCACATCCAGGGCGGGCAGTGCGGGGAACC AGATCGGGGCCAAGTTCTGGGAGGTGATCTGCGACGAGCACGGGATCGACGGGACGGGGCGCTAC GCGGGGGACTCGGACCTGCAGCTGGAGCGGATCAACGCTACTACAACGAGGCCAGCGGGGGCCG GTTCTGTCGGCCGCGCCGTGCTCATGGACCTCGAGCCCCGGCACCATGGACTCGGTGCGCTCCGGCC CCTTCGGCCAGATCTTCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGGG CCAAGGGTCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTCTCGACGTGCTCCGCAAGGAG GCCGAGAACTGCGACTGCCTCCAGGGATTCCAAGTTTGCCATTCTTTGGGAGGAGGCACTGGATCT GGGATGGGCACCCTTCTTATTTCTAAGATTAGGGAGGAGTACCCTGACCGAATGATGCTGACCTTCT CTGTCTTCCCATCAACAAAGGTCTCAGACACCGTCTGTTGAGCCATACAATGCTACACTTTCCGTTTAC CAACTCGTTGAGAACGCTGATGAGTGTATGGTGCTTGACAATGAAGCTCTATACGACATATGTTTCCG CACGCTAAAGCTTGCCACCCCTTCTTTGGTGAACCTGAACCATCTTATCTCTGCTACCATGAGCGGTG TCACATGCTGCCTGAGGTTCCCTGGACAACCTCAACTCCGATCTTCGCAAGCTTGCTGTCAATCTCATC CCATTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATGGTTGGCTTCGCGCCGCTGACGTACGTGGGTACAAAATGT ACCGTGCTCTCACAGTCCCTGAGCTGACTCAGCAATGTGGGATGCCAAGAACATGATGTGTGCCGC AGACCCCGCCACGGCCGTACCTCACCGCTCGGCCCTGTTCCGAGGAAGATGAGCACCAAGG AGGTGGACGAGCAGATGCTCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCTACTTTGTGGAGTGGATCCCCAA CAACGTCAAGTCGAGCGTGTGCGACATGCCGCCAGGGGGCTGAAGATGGCGGGCACCTTCGTGCG GCAACTCCACGTCCATCCAGGAGATGTTCCGCGAGGGTGAGCGAGCAGTTTACGGCCATGTTGAGGA GGAAGGCCTTCTTGCACTGGTACACGGGTGAGGGCATGGACGAGATGGAGTTACCGAGGCGGAG AGCAACATGAACGACCTCGTCCCGGAGTACCAGCAGTACCAGGACGCGACCGCCGAGGAGGATAC GACGAGGAGGAGGAAGAGGAACGCGACGCGGAGTAGTGCCCGTCCCTGCCCAACCCANCANAT GTCCNCCGGTTACAGGTCTGTCCCATGTCCAGGTGCGCTTTCCTCCGGTGAGGGTTTGTGTGGTTT CTCCTGTGGCTTGGATGAGTCGAGGTTGCGTCTTGTGCTCCGTTTGTAAATTTGCTACGGCTAGTAGT GCGTTGCACTCTGTGCTGTTGAGCATCATTGGTCACTCGGTCCATAGCTGACGATGGCTGAAGTC TCGAGTGCTCTCCTTGAGCTAGTCGTCGCTTGTAAAGTTCTGACAAGTATTATTGTTAGTCGTTGCT TCAGCAACCAAAAAATGAGTATTGGTAGTGGTTTCTCATTATCTTTGTGAATATTGTACTTATGTCGGA ATGTTTTGCTTGTATTGTGTATATTTCGTATCTTGTGTTCTTGGTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA
<i>Triticum aesticum</i> U76744	CCCCAACCAATCCCCATCCCCCTCATCCCCCACGCGCAGCGCAACTCTTCAATCCTCTCCTCA GGGAGCGTAGGGAGGCGAAGATGAGGGAGATCCTGCACATCCAGGGCGGGCAGTGCGGGAACCA GATCGGGTCCAAGTTCTGGGAGGTGGTGTGCGACGAGCACGGCATCGACCCACGGGGAGGTACG TCGGCACCTCCGACCTGCAGCTGGAGCGCTCAACGTCTACTACAACGAGGCCCTCGTCCGGCCGCT TCGTGCCGCGCGCCGTGCTCATGGATCTCGAGCCCCGGCACCATGGACTCCGTGCGCACGGGGCCC TACGGCCAGATCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGGGCC AAGGGTCACTACACCGAGGGCGCGGAGCTCATCGACTCCGTCTCGACGTGCTCCGCAAGGAGGC CGAGAAGTGCAGTGCCTCAAGGCTTCCAGGTGTGCCACTCCCTCGCGGGGGCACCGGTTCCG GCATGGGCACGCTGCTGATTTCCAAGATCAGGGAGGAGTACCCGGACCGGATGATGCTCACCTTCT CCGTGTTCCCATCCCCAAGGTGTCTGACACCGTGGTTCGAGCCCTACAACGCCACCCTCTCGGTTCA CCAGCTGGTGGAGAAGCGCGACGAGTGCATGGTGTGACAACGAGGCGCTCTACGACATCTGCTT CCGCACCCTCAAGCTGACCACACCTAGCTTTGGTGACCTGAACCACTTGATCAGTGCCACCATGAGC GGTGTACCTGCTGCCTTCGCTTCCAGGACAGCTGAACCTCAGACCTCCGCAAGTCCGCGTCAAC CTGATCCCCCTTCCGCGCCTCACTTCTTCATGGTGGGCTTTGCGCCGCTCACATCTCGTGGGTAC AGATGTACCGCCCCCTCACTGTCCCTGAGCTCACACAGCAGATGTGGGACTCGAAGAACATGATGTG TGCTGCTGACCCGCGCCATGGCCGCTACCTCACAGCCTCGGCCATGTTCCGTGGCAAGATGAGCAC CAAGGAGGTTGACGAGCAGATGATCAACGTGCAGAACAAGAACTCTCCTACTTCTGTTGAGTGGATC CCGAACAACGTCAAGTCAAGCGTGTGTGACATCCCACCACGCGGCCCTCTCATGGCGTCCACCTTCA TTGGCAACTCCACCTCCATCCAGGAGATGTTAGGCGTGTGAGCGAGCAGTTACCGCCATGTTTCA GAGGAAGGCTTTCTTGCAATTGGTACACTGGCGAGGGGATGGACGAGATGGAGTTCACTGAGGCCGA GAGCAACATGAACGACCTTGTCTCCGAGTACCAGCAGTACCAGGACGCCACTGCCGACGAGGAGGG CGAGTACGAGGAAGAGGAAGAGCTGGAGCAGGAGTAAGATCGGTGACGATTGCATCTCTCCGTTTA TGTGGTATTGTGGTTTTCGTACAACCTGGACC

Noch I. 7

Pflanzenart und GenBank accession No.	β-Tubulin- Sequenz
<i>Eleusine indica</i> AF059289	<p>ATTTGCGACGCCCCGTGCCCGCCTCCCATCTCTGATCTCTCCCCAAACCTCGCCGAACCCCTAGCCCCA CGTCGTGCCCCCTCCGCTGCCGCCATGAGGGAGATCCTCCACATCCAGGGCGGCCAGTGCGGGCA ACCAGATCGGAGCCAAGTTCTGGGAGGTGATCTGCGACGAGCACGGCATCGACCACACCGGCAAGT ACGCAGGCGACTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATCAATGTCTACTACAACGAGGCCGGCGGTGGCC GCTTTGTCCCGCGCGCCGTGCTCATGGACCTCGAGCCCGGCACCATGGACTCCCTGCGCTCGGGC CCGTACGGCCAGATCTTCCGCCCCGACAATTCGTGTTCCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGG GCCAAGGGCCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTGCTCGACGTCTCCGCAAGGA GGCCGAGAACTGCGACTGCTTGCAAGGATTTCAAGTCTGCCACTCATTGGGAGGAGGAACAGGTTC TGGTATGGGTACCCTGCTCATCTCAAAGATCAGGGAGGAGTACCCAGACAGGATGATGTTGACATTC TCAGTTTTCCCATCTCCAAGGTGTGACACCCGTGGTAGAACCTTACAACGCTACGCTCTCAGTTCA TCAGCTTGTTGAGAATGCTGATGAGTGTATGGTCCCTAGACAATGAAGCTCTCTACGACATCTGCTTCC GCACTCTGAAGCTTGCGACACCCACTTTCCGGTATCTGAACCATCTTATCTCTGCAACAATGAGTGGT GTTACCTGCTGCCTGCGGTTCCCTGGCCAGCTGAACCTCGACCTCAGGAAGCTTGCACTCAACTTGA TACCTTCCCTCGCCTCCATTTCTTCATGGTTGGCTTTGCGCCGCTGACCTCAAGGGGGTCCCAACA GTACCGTTCCCTGACTGTTCCGGAGCTGACACAGCAGATGTGGGATGCCAAGAACATGATGTGTGCT GCAGATCCCAGGCACGGCCGCTACCTCACCGCCTCTGCCATGTTCCGTGGGAAGATGAGCACCAAG GAGGTTGACGAGCAGATGCTGAACGTGCAGAACAAGAACTCGTCTACTTTGTTGAGTGGATCCCAA ACAACGTGAAGTCGAGCGTGTGTGACATCCCTCCCAGGGGCCCTGACGATGTATCCACCTTCATCG GCAATTCACCTCCATCCAGGAGATGTTCCGCCGTGTGAGCGAGCAGTTACGGCCATGTTCAGGA GGAAAGGCTTCTTGCACTGGTACACCGGGGAGGGCATGGACGAGATGGAGTTACAGGAGGTGAG AGCAACATGAACGACCTGGTAGCTGAGTACCAGCAGTACCAGGACGCCACAGCAGAAGAGGAAGAG GAGTACGATGATGACGAGGAGGAAGAGGTTGCTGCCTAAGTACCTGCCTAGCTTCTCCGTAGATGT GCTGCTGTTATTATTGCTATTGATCTGTTGCTTGCCGTGCCGTAGACTGTAGGTGGTTGGATCCTTC AAGCTGTTCTATATTGCCTTGGGTTGGTGTGTTTTGCTTAAATGAAATGATGTGCTGTTGCTGTAAA ACCGTGGGGTTAGTTTAACTGTGAGCTTAACTATTACTGGATCATCAAATTATTACTTAGTAGCTATGC CTTCGCCGTGCCCGTGCATAC</p>
<i>Zea mays</i> L10634	<p>CCAGTCGCCATGAGAGAGATCCTCCACATCCAGGGCGGGCAGTGCGGTAACAGATCGGGGCCAA GTTCTGGGAGGTGATATGCGACGAGCACGGCATCGACCACACCGGCAAGTACGCCGGCGACTCCG ACCTCCAGCTCGAGCGCATCAACGTCTACTACAACGAGGCCAGCGGGCGGCCGCTTCGTCCCGCGCG CCGTCTCATGGACCTCGAGCCAGGCACCATGGACTCCGTGCGCTCGGGCCCCCTTCGGCCAGATCT TCCGCCCGGACAATTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGGGCCAAGGGCCACTACA CCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTGCTCGACGTGCTGCGCAAGGAGGCCGAGAATGCGAC TGCTCCAAGGGTTCCAGGTCTGCCACTCGCTGGGAGGAGGTACTGGTTACAGGAATGGGCACCCCTG CTCATCTCCAAGATCAGGGAGGAGTACCCGGACCGGATGATGTTGACATTCTGTCTTCCCGTCGC CCAAGGTGTCTGATACTGTTGTGGAGCCCTACAACGCCACGCTCTCCGTTACACAGCTCGTTGAGAA CGCAGACGAGTGCATGGTGCTCGACAACGAGGCTCTCTATGACATCTGCTTCCGCACGCTCAAGCTT GCCACACCAACCTTTGGTGATCTCAACCACCTTATCTCTGCAACCATGAGTGGTGTACGTGCTGCCT TCGCTTCCCTGGTCAGCTGAATTCTGACCTCCGGAAGCTTGACGTGAACCTGATCCCCTTCCACGT CTGCACTTCTTCATGGTTGGATTTGCTCCACTGACCTCGCGGGGCTCCCAGCAGTACCGCGCTCTCA CCGTGCCAGAGCTGACCCAGCAGATGTGGGACTCCAAGAACATGATGTGTGCTGCTGACCTCGTC ATGGCCGCTACCTCACGGCATCTGCTATGTTCCGTGGGAAGATGAGCACCAAGGAAGTGGATGAAC AGATGCTGAACGTGCAGAACAAGAACTCTTCTACTTCGTGGAGTGGATCCCCAACAACTGAAGTC GAGTGTGTGTGACATTCCACCAATTGGCCTGAAGATGTCCTCCACATTGCTTGGCAACTCAACCTCCA TCCAAGAGATGTTCCGCCGCGTCAGCGAGCAGTTACGGCCATGTTCCAGGAGGAAGGCTTCTTTCG ACTGGTACACAGGCGAGGGTATGGATGAGATGGAGTTACCGAGGCAGAGAGTAACATGAACGAC CTGGTGGCCGAGTATCAGCAGTACCAGGATGCCACTGCCGAGGATGAGGAGTACGAGGAGGAGGA GGAAGAAGAGGAAGAGACCTAAGTCAATTCTCCGCAAGTGGTACAGATATGATATTCCTTGTATCG CTGTTAGTACTCGTCAGTTTGAGGTTGCTGTGGTGTGCTGCTAGGTACTAGATGGTGGTATTGCT TATGAATGCGATGTTGTGCTGACAGAAGTGCATTTTCAATTTGATTATGTTGTTCAAGATGTTATT ACCATGAGGCGAGGTAGCTTGACTGATTGTTGCTATATTTATGCTGCAGTTC</p>

Noch I. 7

Pflanzenart und GenBank accession No.	β -Tubulin- Sequenz
Zea mays X74654	TCTCCCTCGGCCTCGCTCGATCGCTCCCACGCCCTCGCGCCCCCTCCACAAACCACCACCACCCAA GACCGCAGCGCAGGGCGCGAGAGGGATCGGCAGGTCTGGGCAAGATGAGGGAGATCCTGCACATCC AGGGCGGCCAGTGCAGCAACAGATCGGCGCCAAGTTCTGGGAGGTCTGCGGGCAGCAGCGC GTCGACTCCACGGGATGCTACTCGGGTGTCTCCCCGCAGCAGCTCGAGCGGATCAACGTCTACTAC AACGAGGCCGGGGGCGGCCGCTACGTGCCCCGCGCCGTGCTCATGGACCTGGAGCCCCGGCACCAT GGAGTCCATCCGCGCCGGCCCCCTTCGGCGGCATCTTCGCCCCGACAACCTTCGTCTACGGCCAGTC CGGCGCCGGGAACAACCTGGGCCAAGGGCCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTCC TCGACGTGCTGCGCAAGGAGGGCCGAGAACTGCGACTGCCTCCAAGGGTTCCAAGTATGCCACTCCC TGGGTGCGCGCACTGGTTCTGGCATGGGCACGCTGCTCATCTCCAAGATCCGGGAGGAGTACCCAG ACCGCATGATGCTGACCTTCTCCGTGTTCCCGTCGCCCAAGGTGTCCGACACCGCTCGTGAGGCCCT ACAACGCGACCCTGTCCGTGCACACGCTGGTGGAGAACGCCGACGAGTGCATGGTCTTGACAACG AGGCGCTCTATGATATTTGCTTCCGCACCCTCAAGCTCACCAACCCTTCATTTGGCGACCTGAACCAT CTGATCTCGGCGACCATGAGCGGCGTGACGTGCTGCGTTCGCGGTCGCGGTCGAGTGAACCTCGGA CCTCCGCAAGCTGGCGGTGAACCTGATCCCGTTCGCGCGGCTGCACTTCTTCATGGTGGGGTTCGC GCCGCTGACGTGCGCGGGGTGCGAGCAGTACCGCGCGCTGACGTGCGCGGCTGACGACGAGCAG ATGTGGGACGCCAAGAACATGATGTGCGCGGCGGACCCGCGGCACGGGCGGTACCTGACGGCGTC CGCCATGTTCCGGGGCAAGATGAGCACAAGGAGGTGGACGAGCAGATGATCAACGTGCAGAACAA GAACTCCTCCTACTTCGTGGAGTGGATCCCCAACACGTCAAGTCCAGCGGTGTGCGACATCCCGCCC GTCCGGGTGTCATGTCTTCCACCTTCGTGGGCAACTCCACCTCCAGGATGATTTCCGCGC GTGAGCGAGCAGTTCACGGCCATGTTACGGCGCAAGGCCCTTCCTGCATTTGGTACACCGAGGGGC ATGGACGAGATGGAGTTCACCGAAGCCGAGAGCAACATGAACGACCTCGTCGCGGAGTACCAGCAG TACCAAGACGCCACAGCCGAGGAGTACGACGAGGAAGAGCAGGACGGCGAGGAGGAGCAGCACTG ATCGATGCAACGGGCTTCAGAGTCTTCGCTGCTGTGGTACATCAATTGGAATAAGTTCCTACAAT CCTATACTACCTACCTTAAGCATATGTATTGATGCACTTCTGATTTCCGTTGCTGCTGCTGACTGTG TGTGTGTATCTACAATCGTGTGTGTAGTGTGTTGTGATATGTTGTCCCCGTTGTCCAGGATTTGTG CGTATGATTATTCATATGATGGGATTAATTGCTT
Zea mays X52879	CGCTCACTCCCGAGTCCCGATCGCAACCGCCCCCACATTCGCCAGAGTTAGCCCGATCAGATCGTT TTTCCCTCGAGGTGAGAGTAAGATGAGGGAGATCCTGCATATCCAGGGAGGGCAGTGCGGGAAACCA GATCGGCTCCAAGTTCTGGGAGGTGGTGTGCGATGAGCACGGCATCGACCCGACGGGGCGGTACA TGGGGACGTGCGACGTGCAGCTGGAGCGCGTCAACGTCTACTACAACGAGGCTTCATGTGGTAGGT TCGTGCCGCGCGCGGTGCTCATGGACCTTGAGCCCCGCCACCATGGACGCCGTCCGCACGGGCCCC TACGGCCAGATCTTCCGCCAGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGGGCC AAGGGGCACTACACCGAGGGGGCGGAGCTCATCGACTCCGTCTTGACGTGCTCCGTAAGGAGGC CGAGAACTGCGACTGCCTCCAGGGTTTTAGGTCTGCCACTCGCTCGGCGGTGGCACGGGGTCTGG CATGGGTACCCTGCTCATTCTAAGATTAGAGAGGAGTACCCGGATCGAATGATGATGACGTTCTCC GTCTTCCCATCCCCAAGGTGTGCGACACGGTGGTTCGAGCCCTATAACGCCACGCTCTCTGTCCAC CAGCTCGTGGAGAACGCCGACGAGTGCATGGTGTGCTGGACAATGAGGCACTATACGACATCTGCTTC CGCAGCTGAAGCTGACTACTCCAGCTTTGGTGTCTGAACCACTTGATCAGTGCCACCATGAGTG GTGTCACTGCTGCCTTCGCTTCCAGGGCAGCTGAACTCTGACCTCCGCAAGCTTGCTGTCAACCT GATTCCCTTCCACGCTGCACTTTTTCATGTTGGCTTTGACCGCTGACCTCGCGTGGCTCCAG CAGTACCGCTCCCTGACGGTCCCTGAGCTGACCCAGCAGATGTGGGACTCCAAGAACATGATGTGT GCCGCAGACCCACGTGATGGCCGCTACCTGACGGCTCTGCCATGTTCCGTGGCAAGATGAGCACC AAGGAGGTAGACGAGCAAAATGATAAATGTGCAGAACAAAGAACTCGTCCCTACTTTGTGGAGTGGATT CTAACACGTTAAATCGAGCGTTTGTGACATCCCCCTCGTGGCCTCTCCATGCTTCCACCTTCGTG GGTAACTCCACCTCGATTGAGGAGATGTTCCGGCGTGTGAGTGAGCAGTTCACGGCCATGTTTCAGGA GGAAGGCCCTTCTTGCACTGGTACACAGGCGAGGGCATGGATGAGATGGAGTTCAGTGGGCTGAGA GCAACATGAACGACCTCGTCTCCGAGTACCAGCAGTATCAGGACGCTACAGCCGATGAGGAGGCCG ACTATGAGGAAGAGGAGGCGGCGGCGAGTGAGGCCTTCTGCCATGTTGTGCGGGGTTGGCT TTGGGGTTTTCTTTCACCTTGATGCTACCTCAACGATATGCAATATCTCCTGTTTGATATATCTGCTGCT TGTGTACGCTACCGCTACGTTCTGCACTCTTAATAAATATATATGTTAGTTC

I. 8 Sequenz des β -Tubulin-Fragmentes von *A. arenaria*

TCTCCCCACCTGCGTAGGATTAGGCGACGAGCTCGGCTCCGACCCACGGGCGGTACGCGGGCGCCGCCGACCCC
CAGTGAGCGCTGCACTACTACAACGAGGCCGGGGCGGCCGCTTCTGCCCCGCGCCTGCCCTGGAGTGGAGCCG
GGCACCTGGACACGGACCGCACCAGGGCTACGGCCAGAGTTGCCGCCCGACAACCTACGACTTCGGCCAGTCCG
GCGCCGGCAACAACCTGGGCCAAGGGCCACTACACCGAGGGCGCCGAGCTCATCGACTCCGTCTCGACGTCTCCGCA
AGGAGGCCGAGAACTGGACTGCAATG

Anhang J Ergebnisse der BLAST-Suche

J. 1 Ergebnisse der Nucleotid-Nucleotid-BLAST-Suche (BLASTN), die zu der Artbestimmung der untersuchten Pilzisolat mit Hilfe der 28S-rRNA-Region herangezogen wurden

J. 1.1 Ergebnisse der BLAST-Suche für *Ac. strictum*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 85700777 gb DQ365384.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	1148	0.0
gi 31559733 gb AY138483.1 	Acremonium strictum genogroup I st...	1144	0.0
gi 85700930 gb DQ365537.1 	Uncultured compost fungus clone 5F...	1140	0.0
gi 85700885 gb DQ365492.1 	Uncultured compost fungus clone 4F...	1140	0.0
gi 85700772 gb DQ365379.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	1140	0.0
gi 31559735 gb AY138485.1 	Acremonium strictum genogroup I st...	1136	0.0
gi 39547983 gb AY464867.1 	Uncultured fungus clone FF32 26S r...	1132	0.0
gi 85700937 gb DQ365544.1 	Uncultured compost fungus clone 5F...	1132	0.0
gi 85700923 gb DQ365530.1 	Uncultured compost fungus clone 5F...	1132	0.0
gi 85700908 gb DQ365515.1 	Uncultured compost fungus clone 4F...	1132	0.0
gi 85700849 gb DQ365456.1 	Uncultured compost fungus clone 3F...	1126	0.0
gi 85700850 gb DQ365457.1 	Uncultured compost fungus clone 3F...	1124	0.0
gi 19908804 gb AF452040.1 	Hyponectria sp. HKUCC 5553 large s...	1120	0.0
gi 85700721 gb DQ365328.1 	Uncultured compost fungus clone 0F...	1118	0.0
gi 85700904 gb DQ365511.1 	Uncultured compost fungus clone 4F...	1116	0.0
gi 85700835 gb DQ365442.1 	Uncultured compost fungus clone 3F...	1116	0.0
gi 85700753 gb DQ365360.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	1102	0.0
gi 85700766 gb DQ365373.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	1100	0.0
gi 50058272 gb AY633564.1 	Cf. Acremonium sp. FSU2858 28S lar...	1090	0.0
gi 30840230 emb AJ558115.1 NMA558115	Nectria mauriticola 18S...	1060	0.0

J. 1.2 Ergebnisse der BLAST-Suche für *F. culmorum*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 48766830 gb AY628198.1 	Uncultured fungus clone 22 28S rib...	1168	0.0
gi 14581427 gb AY015631.1 	Persiciospora africana strain ATCC...	1160	0.0
gi 37778816 gb AY188924.1 	Gibberella zeae 18S ribosomal RNA ...	1130	0.0
gi 37778807 gb AY188915.1 	Fusarium poae 18S ribosomal RNA ge...	1112	0.0
gi 29466981 dbj AB067709.1 	Cordyceps sinensis gene for 28S r...	1108	0.0
gi 37778809 gb AY188917.1 	Fusarium sporotrichioides 18S ribo...	1104	0.0
gi 37778814 gb AY188922.1 	Fusarium venenatum 18S ribosomal R...	1097	0.0
gi 37778813 gb AY188921.1 	Gibberella pulicaris 18S ribosomal...	1087	0.0
gi 2728 emb X65476.1 FS28SRDNC	F.sambucinum (NRRL 13504, 1371...	1079	0.0
gi 2727 emb X65475.1 FS28SRDNB	F.sambucinum (NRRL 20765) 5' end	1079	0.0
gi 2957184 gb AF006321.1 AF006321	Fusarium cerealis 28S ribosoma	1073	0.0
gi 2957183 gb AF006320.1 AF006320	Fusarium cerealis 28S ribosoma	1073	0.0
gi 2726 emb X65474.1 FS28SRDNA	F.sambucinum (NRRL 13708, 1370...	1071	0.0
gi 37786665 gb AY213704.1 	Fusarium acutatum strain CBS 402.9...	1063	0.0
gi 15637127 gb AF291060.1 AF291060	Fusarium proliferatum NRRL...	1063	0.0
gi 2957185 gb AF006322.1 AF006322	Fusarium culmorum 28S ribosoma	1057	0.0
gi 37786667 gb AY213706.1 	Fusarium chlamydosporum var. fusc...	1055	0.0
gi 37778808 gb AY188916.1 	Gibberella fujikuroi 18S ribosomal...	1055	0.0
gi 24417138 dbj AB084297.1 	Gibberella zeae gene for 28S rRNA, p	1051	0.0
gi 2957186 gb AF006323.1 AF006323	Fusarium flocciferum 28S ribos	1049	0.0

J. 1.3 Ergebnisse der BLAST-Suche für *M. bolleyi*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 85700823 gb DQ365430.1 	Uncultured compost fungus clone 2F...	1159	0.0
gi 85700798 gb DQ365405.1 	Uncultured compost fungus clone 2F...	1159	0.0
gi 85700774 gb DQ365381.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	1159	0.0
gi 19908794 gb AF452030.1 	Monographella nivalis large subuni...	1149	0.0
gi 85700746 gb DQ365353.1 	Uncultured compost fungus clone 0F...	1147	0.0
gi 85700741 gb DQ365348.1 	Uncultured compost fungus clone 0F...	1147	0.0
gi 85700715 gb DQ365322.1 	Uncultured compost fungus clone 0F...	1147	0.0
gi 85700817 gb DQ365424.1 	Uncultured compost fungus clone 2F...	1143	0.0
gi 85700808 gb DQ365415.1 	Uncultured compost fungus clone 2F...	1143	0.0
gi 39547986 gb AY464870.1 	Uncultured fungus clone FF35 26S r...	1121	0.0
gi 85700783 gb DQ365390.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	1048	0.0
gi 37956340 gb AY261182.1 	Arthrobotrys foliicola strain CBS ...	1030	0.0
gi 85700723 gb DQ365330.1 	Uncultured compost fungus clone 0F...	992	0.0
gi 85700770 gb DQ365377.1 	Uncultured compost fungus clone 1F...	986	0.0
gi 88854009 gb DQ384572.1 	Xylariales sp. F15195 18S ribosoma...	902	0.0
gi 85700839 gb DQ365446.1 	Uncultured compost fungus clone 3F...	866	0.0
gi 16519411 dbj AB073534.1 	Xylaria sp. KU416 gene for 28S rR...	864	0.0
gi 27447250 gb AY083835.1 	Oxydothis frondicola 28S large sub...	825	0.0
gi 19908811 gb AF452047.1 	Dyrithiopsis lakefuxianensis large...	825	0.0
gi 14488011 gb AF382380.1 	Discostroma sp. HKUCC 1004 strain ...	825	0.0

J. 1.4 Ergebnisse der BLAST-Suche für *G. graminis*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 85068204 gb DQ341495.1 	Gaeumannomyces graminis var. avena...	1254	0.0
gi 16565888 gb AF362556.1 AF362556	Gaeumannomyces graminis va...	1246	0.0
gi 85068202 gb DQ341493.1 	Gaeumannomyces amomi CMUZE002 larg...	1238	0.0
gi 16565889 gb AF362557.1 AF362557	Gaeumannomyces graminis va...	1238	0.0
gi 85068205 gb DQ341496.1 	Gaeumannomyces graminis var. grami...	1222	0.0
gi 85068206 gb DQ341497.1 	Gaeumannomyces graminis var. triti...	1216	0.0
gi 85068207 gb DQ341498.1 	Magnaporthe salvinii CBS 243.76 la...	1182	0.0
gi 85068203 gb DQ341494.1 	Gaeumannomyces cylindrosporus CBS ...	1166	0.0
gi 85068201 gb DQ341492.1 	Buergenerula spartinae ATCC 22848 ...	1166	0.0
gi 85068223 gb DQ341514.1 	Pyriculariopsis parasitica HKUCC55...	1122	0.0
gi 94540575 gb DQ493955.1 	Magnaporthe grisea 70-15 clone 61J...	1104	0.0
gi 16565886 gb AF362554.1 AF362554	Magnaporthe grisea isolate...	1104	0.0
gi 4760879 dbj AB026819.1 	Magnaporthe grisea genes for 18S r...	1104	0.0
gi 85068220 gb DQ341511.1 	Pyricularia borealis CBS 461.65 la...	1094	0.0
gi 85068221 gb DQ341512.1 	Dactylaria higginsii CBS 665.79 la...	1032	0.0
gi 45016517 gb AY536697.1 	Uncultured fungus clone YC07 26S r...	998	0.0
gi 39548054 gb AY464938.1 	Uncultured fungus clone FF07 26S r...	998	0.0
gi 39547982 gb AY464866.1 	Uncultured fungus clone FF31 26S r...	998	0.0
gi 39547992 gb AY464876.1 	Uncultured fungus clone FF41 26S r...	982	0.0
gi 39547975 gb AY464859.1 	Uncultured fungus clone FF24 26S r...	982	0.0

J. 2 Ergebnisse der Nucleotid-Nucleotid-BLAST-Suche, die zur Artbestimmung der untersuchten Pilzisolat mit Hilfe der *ITS*-Region herangezogen wurden

J. 2.1 Ergebnisse der BLAST-Suche für *A. strictum*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 32441962 gb AY214439.1 	Acremonium strictum strain CBS 346...	1033	0.0
gi 31442886 gb AY138845.1 	Acremonium strictum genogroup I st...	1033	0.0
gi 1373301 gb U57671.1 ASU57671	Acremonium strictum rDNA inte...	1027	0.0
gi 31442889 gb AY138848.1 	Acremonium strictum genogroup I st...	1001	0.0
gi 48429292 gb AY618218.1 	Acremonium strictum internal trans...	986	0.0
gi 50401965 gb AY566998.1 	Acremonium strictum strain CBS 346...	984	0.0
gi 48374899 gb AY625058.1 	Acremonium strictum strain ATCC 10...	974	0.0
gi 90568171 emb AM161121.1 	Acremonium strictum ITS1, 5.8S rR...	970	0.0
gi 75173009 gb DQ132831.1 	Acremonium strictum internal trans...	958	0.0
gi 95140279 emb AM262390.1 	Acremonium strictum 5.8S rRNA gen...	944	0.0
gi 41351297 emb AJ621771.1 	Acremonium strictum 5.8S rRNA gen...	940	0.0
gi 66912519 gb DQ007049.1 	Torrubiella confragosa strain V71 ...	914	0.0
gi 66912518 gb DQ007048.1 	Torrubiella confragosa strain V73 ...	874	0.0
gi 83272577 gb DQ297552.1 	Acremonium strictum isolate ZMS-29...	759	0.0
gi 98963065 gb DQ459004.1 	Fungal endophyte sp. DF3 18S ribos...	727	0.0
gi 31442887 gb AY138846.1 	Acremonium strictum genogroup III ...	727	0.0
gi 90568180 emb AM161130.1 	Acremonium strictum 18S rRNA gene...	727	0.0
gi 90568176 emb AM161126.1 	Acremonium strictum 18S rRNA gene...	727	0.0
gi 90568172 emb AM161122.1 	Acremonium strictum ITS1, 5.8S rR...	727	0.0
gi 30840230 emb AJ558115.1 NMA558115	Nectria mauritiicola 18S...	727	0.0

J. 2.2 Ergebnisse der BLAST-Suche für *F. culmorum*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 19569156 gb AF484956.1 	Fusarium culmorum strain BK985T 18...	953	0.0
gi 28394561 gb AY147335.1 	Fusarium culmorum isolate K1005 18...	953	0.0
gi 28394559 gb AY147333.1 	Fusarium culmorum isolate K1003 18...	953	0.0
gi 28394552 gb AY147326.1 	Fusarium culmorum isolate K985 18S...	953	0.0
gi 28394550 gb AY147324.1 	Fusarium culmorum isolate K311 18S...	953	0.0
gi 28394546 gb AY147320.1 	Fusarium culmorum isolate FC54 18S...	953	0.0
gi 28394526 gb AY147300.1 	Fusarium culmorum isolate F12271 1...	953	0.0
gi 28394512 gb AY147286.1 	Fusarium culmorum isolate CAF1 18S...	953	0.0
gi 91694233 gb DQ453700.1 	Fusarium culmorum voucher Fc 2 18S...	951	0.0
gi 28394565 gb AY147339.1 	Fusarium culmorum isolate K1226 18...	951	0.0
gi 28394567 gb AY147341.1 	Fusarium culmorum isolate K1455 18...	949	0.0
gi 28394530 gb AY147304.1 	Fusarium culmorum isolate F12282 1...	947	0.0
gi 28394586 gb AY147360.1 	Fusarium culmorum isolate KF351 18...	947	0.0
gi 91694236 gb DQ453703.1 	Fusarium culmorum voucher CBS 122....	945	0.0
gi 28394545 gb AY147319.1 	Fusarium culmorum isolate FC36 18S...	945	0.0
gi 28394544 gb AY147318.1 	Fusarium culmorum isolate FC32 18S...	945	0.0
gi 28394543 gb AY147317.1 	Fusarium culmorum isolate FC30 18S...	945	0.0
gi 28394541 gb AY147315.1 	Fusarium culmorum isolate FC12 18S...	945	0.0
gi 28394532 gb AY147306.1 	Fusarium culmorum isolate ITCC148 ...	945	0.0
gi 28394531 gb AY147305.1 	Fusarium culmorum isolate ITCC146 ...	945	0.0

J. 2.3 Ergebnisse der BLAST-Suche für *M. bolleyi*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 6706309 emb AJ279489.1 MSP279489	Microdochium sp. 4/97-103...	878	0.0
gi 6706307 emb AJ279477.1 MSP279477	Microdochium sp. 5/97-48 ...	878	0.0
gi 6706306 emb AJ279475.1 MSP279475	Microdochium bolleyi ITS1...	878	0.0
gi 6706303 emb AJ279454.1 MSP279454	Microdochium bolleyi ITS1, 5	878	0.0
gi 6706273 emb AJ279485.1 M4279485	Microdochium sp. 4/97-7 IT...	878	0.0
gi 29826148 gb AY243053.1 	Ascomycete sp. Ano10TA internal tr...	860	0.0
gi 21666830 gb AF455402.1 	Microdochium sp. wb587 isolate wb5...	684	0.0
gi 3201954 gb AF067642.1 AF067642	Microdochium nivale 18S rib...	644	0.0
gi 5420283 emb AJ246155.1 MSP246155	Microdochium sp. 00019 5S...	624	6e-176
gi 33867374 gb AY293061.1 	Sphaerulina musae 18S ribosomal RN...	617	2e-173
gi 85376535 gb DQ317371.1 	Uncultured Xylariales clone DGGE b...	615	6e-173
gi 88854009 gb DQ384572.1 	Xylariales sp. F15195 18S ribosoma...	613	2e-172
gi 78644027 emb AM084813.1 	Ascomycete sp. OS-S36 5.8S rRNA g...	603	2e-169
gi 78644012 emb AM084798.1 	Ascomycete sp. OS-S21 5.8S rRNA g...	603	2e-169
gi 72255722 gb DQ092523.1 	Microdochium sp. HKB33 18S ribosom...	575	5e-161
gi 90102888 gb DQ421204.1 	Uncultured soil fungus clone 174-2...	571	8e-160
gi 90102887 gb DQ421203.1 	Uncultured soil fungus clone 174-7...	571	8e-160
gi 90102889 gb DQ421205.1 	Uncultured soil fungus clone 174-3...	563	2e-157
gi 2951988 gb U51954.1 AFU51954	Arthrobotrys foliicola intern...	531	7e-148
gi 6706308 emb AJ279481.1 MSP279481	Microdochium sp. 5/97-16 ...	505	4e-140

J. 2.4 Ergebnisse der BLAST-Suche für *G. graminis*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 41056274 gb AY428777.1 	Gaeumannomyces graminis var. avena...	516	2e-143
gi 577446 gb U17210.1 U17210	Gaeumannomyces graminis var. tri...	516	2e-143
gi 577443 gb U17207.1 U17207	Gaeumannomyces graminis var. ave...	516	2e-143
gi 63107093 emb AJ969262.1 	Gaeumannomyces graminis var. trit...	514	8e-143
gi 5123766 emb AJ246153.1 GGR246153	Gaeumannomyces graminis 5...	514	8e-143
gi 5123763 emb AJ246150.1 GGR246150	Gaeumannomyces graminis 5...	514	8e-143
gi 4741412 emb AJ010037.1 GGR10037	Gaeumannomyces graminis va...	514	8e-143
gi 20805923 gb AF508155.1 	Gaeumannomyces graminis var. triti...	514	8e-143
gi 41056281 gb AY428784.1 	Gaeumannomyces graminis var. triti...	514	8e-143
gi 41056275 gb AY428778.1 	Gaeumannomyces graminis var. avena...	514	8e-143
gi 577456 gb U17220.1 U17220	Gaeumannomyces graminis var. tri...	514	8e-143
gi 577455 gb U17219.1 U17219	Gaeumannomyces graminis var. tri...	514	8e-143
gi 577444 gb U17208.1 U17208	Gaeumannomyces graminis var. tri...	514	8e-143
gi 5123765 emb AJ246152.1 GGR246152	Gaeumannomyces graminis 5...	506	2e-140
gi 5123764 emb AJ246151.1 GGR246151	Gaeumannomyces graminis 5...	506	2e-140
gi 4741398 emb AJ010036.1 GGR10036	Gaeumannomyces graminis va...	506	2e-140
gi 4741393 emb AJ010031.1 GGR10031	Gaeumannomyces graminis va...	506	2e-140
gi 20805935 gb AF508789.1 	Gaeumannomyces graminis var. triti...	506	2e-140
gi 41056280 gb AY428783.1 	Gaeumannomyces graminis var. triti...	506	2e-140
gi 577458 gb U17222.1 U17222	Gaeumannomyces graminis var. tri...	506	2e-140

J. 3 Ergebnisse der Nucleotid-Nucleotid-BLAST-Suche (TBLASTN; EST_others) mit der zur Basis stehenden Sequenz der putativen Prolinoxidase von *O. sativa*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 50338268 gb CO533394.1 	3530_1_219_1_F06.x_1 3530 - Full...	333	4e-90
gi 32778158 gb CD930394.1 	GR45.111C11F010418 GR45 Triticum...	306	6e-82
gi 32687545 gb CD913221.1 	G550.117D08R010921 G550 Triticum...	294	1e-80
gi 50330676 gb CO525802.1 	3530_1_171_1_E08.x_1 3530 - Full...	292	7e-78
gi 45968619 gb CN136042.1 	OX1_40_A08.g1_A002 Oxidatively-s...	290	5e-77
gi 50330677 gb CO525803.1 	3530_1_171_1_E08.y_1 3530 - Full...	289	6e-77
gi 32639924 gb CD881169.1 	F1.102C19F010328 F1 Triticum aes...	287	2e-76
gi 21973958 gb BQ765484.1 	EBro03_SQ007_E12_R root, 3 week,...	287	3e-76
gi 36034446 gb CA287197.1 	SCSBSD2058F06.g SD2 Saccharum of...	267	4e-75
gi 36034449 gb CA287198.1 	SCSBSD2058F07.g SD2 Saccharum of...	270	4e-71
gi 31664367 gb CD573092.1 	3529_1_126_1_E07.y_1 3529 - 2 mm...	266	5e-70
gi 53694900 gb CV470124.1 	42927.1 Common Scab-Challenged T...	262	1e-68
gi 45971372 gb CN137626.1 	OX1_58_B10.g1_A002 Oxidatively-s...	259	5e-68
gi 48821520 gb CO122833.1 	GR__Eb04K15.f GR__Eb Gossypium r...	258	1e-67
gi 52570144 gb CV287676.1 	aof01-2ms1-e11 Aof01 Asparagus o...	257	3e-67
gi 48815295 gb CO116608.1 	GR__Eb018P07.r GR__Eb Gossypium ...	251	2e-65
gi 21941952 gb BM373525.2 	EBma04_SQ004_M06_R maternal, 10 ...	247	3e-64
gi 45966516 gb CN134759.1 	OX1_28_F10.b1_A002 Oxidatively-s...	246	4e-64
gi 45966661 gb CN134834.1 	OX1_28_F10.g1_A002 Oxidatively-s...	246	6e-64
gi 52495062 gb CV242087.1 	WS02514.B21.1_B14 PT-MB-N-A-15 P...	243	4e-63

J. 4 Ergebnisse der Protein-BLAST-Suche (BLASTP) nach den homologen Proteinen mit der zur Basis stehenden Sequenz der putativen Prolinoxidase von *O. sativa*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 37536688 ref NP_922646.1 	putative proline oxidase [Oryza ...	671	0.0
gi 78708991 gb ABB47966.1 	proline oxidase, putative [Oryza s...	671	0.0
gi 40457261 gb AAR86686.1 	proline dehydrogenase [Glycine max]	364	4e-99
gi 48525718 gb AAT45085.1 	proline dehydrogenase [Medicago sa...	360	1e-97
gi 18253083 dbj BAB83948.1 	CIG1 [Nicotiana tabacum]	345	2e-93
gi 49182346 gb AAT57675.1 	proline oxidase/dehydrogenase 2 [Nico	337	9e-91
gi 49182344 gb AAT57674.1 	proline oxidase/dehydrogenase 1 [Nico	334	6e-90
gi 15240986 ref NP_198687.1 	proline dehydrogenase [Arabidops...	330	9e-89
gi 10176897 dbj BAB10129.1 	proline oxidase precursor [Arabidops	330	9e-89
gi 18377849 gb AAL67111.1 	At3g30775/MIF6.16 [Arabidopsis thalia	327	7e-88
gi 16226335 gb AAL16138.1 	At3g30775/MIF6.16 [Arabidopsis thalia	327	7e-88
gi 42565343 ref NP_189701.3 	ERD5 (PROLINE OXIDASE); proline ...	327	7e-88
gi 1778015 gb AAB40615.1 	osmotic stress-induced proline dehy...	326	1e-87
gi 1817544 dbj BAA11682.1 	proline oxidase precursor [Arabidopsi	325	3e-87
gi 1531760 emb CAA65783.1 	proline oxidase [Arabidopsis thaliana	325	3e-87
gi 32140553 dbj BAC78193.1 	proline dehydrogenase [Raphanus sati	175	4e-42
gi 71534940 gb AAZ32874.1 	proline dehydrogenase [Medicago sativ	153	2e-35
gi 66819703 ref XP_643510.1 	hypothetical protein DDB0167252 ...	145	4e-33
gi 45946858 gb AAH68260.1 	PRODH protein [Homo sapiens]	136	2e-30
gi 63102259 gb AAH94736.1 	PRODH protein [Homo sapiens]	136	2e-30

J. 5 Ergebnisse der Nucleotid-Nucleotid-BLAST-Suche (TBLASTN; EST_others) mit der zur Basis stehenden Sequenz des Klons 2

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 82765197 gb DV858759.1 	col6019 Colonial bentgrass EST Agr...	323	2e-85
gi 82766404 gb DV859966.1 	col7227 Colonial bentgrass EST Agr...	305	6e-80
gi 21973958 gb BQ765484.1 	EBro03_SQ007_E12_R root, 3 week, w...	281	9e-73
gi 21942890 gb BM096889.2 	EBma08_SQ001_O16_R maternal, 28 DP...	281	9e-73
gi 13258286 gb BG369185.1 	HVSMEi0023A10f Hordeum vulgare 20 ...	281	9e-73
gi 93231802 dbj CJ690361.1 	CJ690361 Y.Ogihara unpublished cD...	273	2e-70
gi 93193303 dbj CJ583941.1 	CJ583941 Y.Ogihara unpublished cD...	273	2e-70
gi 32778158 gb CD930394.1 	GR45.111C11F010418 GR45 Triticum a...	273	2e-70
gi 32687545 gb CD913221.1 	G550.117D08R010921 G550 Triticum a...	273	2e-70
gi 25225314 gb CA647018.1 	wre1n.pk0110.d12 wre1n Triticum ae...	273	2e-70
gi 25189803 gb CA611506.1 	wr1.pk0131.d5 wr1 Triticum aestivu...	273	2e-70
gi 24993363 gb CA502403.1 	WHE4047_A12_B23ZT Wheat meiotic an...	273	2e-70
gi 22142484 gb BQ838166.1 	WHE2907_C10_F19ZS Wheat aluminum-s...	273	2e-70
gi 32679284 gb CD904956.1 	G468.100B14R010928 G468 Triticum a...	265	6e-68
gi 31367770 gb CD453030.1 	WHE1452_G01_M02ZT CS wheat etiolat...	257	1e-65
gi 59942257 gb DN156363.1 	GCA001A14x GCA Hordeum vulgare cDN...	253	2e-64
gi 62740337 dbj AB208432.1 	AB208432 strawberry cv. shikinari...	247	1e-62
gi 32449251 gb CD777460.1 	PE39 Avicennia marina leaf cDNA Li...	247	1e-62
gi 50872728 gb CD051336.1 	EST0881 subtracted cDNA library of...	247	1e-62
gi 32362604 gb CB074223.1 	EST01000 Virulent Peronospora para...	247	1e-62

J. 6 Ergebnisse der Nucleotid-Nucleotid-BLAST-Suche (TBLASTN) mit der zur Basis stehenden Sequenz des β -Tubulin-Fragmentes von *A. arenaria*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 44804357 gb AC130607.2 	Oryza sativa (japonica cultivar-...	200	2e-48
gi 58530791 dbj AP008211.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	200	2e-48
gi 34327937 dbj AB104732.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	200	2e-48
gi 50917472 ref XM_469133.1 	Oryza sativa (japonica cultiva...	196	2e-47
gi 58531193 dbj AP008212.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 58530789 dbj AP008209.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 34327939 dbj AB104733.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 37991745 dbj AK122099.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 37990944 dbj AK121321.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 32979261 dbj AK069237.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 52077229 dbj AP005610.3 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 52076979 dbj AP005192.3 	Oryza sativa (japonica cultivar...	196	2e-47
gi 40316850 gb AC137991.3 	Oryza sativa chromosome 3 BAC OS...	196	2e-47
gi 39226998 gb AC139174.3 	Oryza sativa chromosome 3 BAC OS...	196	2e-47
gi 508575 gb L33263.1 RICBTUBULI	Oryza sativa beta-tubulin ...	196	2e-47
gi 493724 emb X79367.1 OSBETATU	O.sativa mRNA for beta-tubulin	188	6e-45
gi 50905514 ref XM_464246.1 	Oryza sativa (japonica cultiva...	188	6e-45
gi 58530788 dbj AP008208.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	188	6e-45
gi 37991197 dbj AK121574.1 	Oryza sativa (japonica cultivar...	188	6e-45
gi 493709 dbj D30717.1 RICBTB	Oryza sativa (japonica cultiv...	188	6e-45

J. 7 Ergebnisse der Nucleotid-Nucleotid-BLAST-Suche (TBLASTN) mit der zur Basis stehenden Sequenz des 18S-rRNA-Fragmentes von *A. arenaria*

Die ersten 20 Sequenzen, die ein signifikantes Alignment ergaben		Score (bits)	E Value
gi 55793458 gb AY786468.1 	Erianthus arundinaceus clone IJ 76...	293	8e-77
gi 84095191 dbj AP008225.1 	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	293	8e-77
gi 12584284 gb AY012384.1 	Gronophyllum pinangoides 18S small...	293	8e-77
gi 12584271 gb AY012371.1 	Reinhardtia simplex 18S small subu...	293	8e-77
gi 37545144 gb AY120865.1 	Oryza longistaminata small subunit...	293	8e-77
gi 7595460 gb AF206940.1 	Ixiolirion tataricum 18S ribosomal RNA	293	8e-77
gi 7595392 gb AF206872.1 	Borya septentrionalis 18S ribosomal RN	293	8e-77
gi 7595389 gb AF206869.1 	Blandfordia punicea 18S ribosomal RNA	293	8e-77
gi 7595381 gb AF206861.1 	Barbacenia elegans 18S ribosomal RNA g	293	8e-77
gi 71143015 dbj AB222296.1 	Uncultured eukaryote gene for 18S...	293	8e-77
gi 71143014 dbj AB222295.1 	Uncultured eukaryote gene for 18S...	293	8e-77
gi 58652042 dbj AP008245.2 	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	293	8e-77
gi 6273825 gb AF168865.1 AF168865	Orchidantha fimbriata 18S s...	293	8e-77
gi 6273822 gb AF168862.1 AF168862	Musella lasiocarpa 18S smal...	293	8e-77
gi 6273815 gb AF168855.1 AF168855	Joinvillea ascendens 18S sm...	293	8e-77
gi 6273809 gb AF168849.1 AF168849	Heliconia latispatha 18S sm...	293	8e-77
gi 6273800 gb AF168840.1 AF168840	Elasis hirsuta 18S small su...	293	8e-77
gi 20359 emb X00755.1 OSRRN17S	Rice gene for 17S ribosomal RNA	293	8e-77
gi 20975721 emb Z94153.1 	Ammophila arenaria partial 18S rRNA ge	293	8e-77
gi 42821624 dbj AK105009.2 	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	293	8e-77

Anhang K Zusammensetzung des Murashige & Skoog- Mediums

nach Murashige & Skoog (1962)

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration (pro 1 L)
Fe-Quelle		
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	278 mg / 100 ml	27,8 mg
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	373 mg / 100 ml	37,3 mg
Mikroelemente		
KI	83 mg / 100 ml	0,83 mg
H ₃ BO ₄	620 mg / 100 ml	6,20 mg
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	2,23 g / 100 ml	22,30 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	860 mg / 100 ml	8,60 mg
Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	250 mg / 100 ml	2,25 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg / 100 ml	0,025 mg
CoCl x 6 H ₂ O	25 mg / 100 ml	0,025 mg
Makroelemente		
NH ₄ NO ₃	1650 mg / 100 ml	1650 mg
KNO ₃	1900 mg / 100 ml	1900 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440 mg / 100 ml	440 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370 mg / 100 ml	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg / 100 ml	170 mg
Vitamine		
myo-Inositol	1g / 100 ml	100 mg
Nicotinsäure	50 mg / 100 ml	0,5 mg
Pyridoxin x HCl	50 mg / 100 ml	0,5 mg
Thiamin x HCl	10 mg / 100 ml	0,1 mg
Glycin	200 mg / 100 ml	2 mg

Anhang L Ergebnisse der spektrophotometrischen Bestimmung der RNA-Gehalte in den RNA-Extrakten von *A. arenaria*

Die Bestimmung der RNA-Gehalte erfolgte in einer Doppelmessung bei den Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm. Die Ausrechnung der RNA-Konzentration im µg/ml erfolgte mit folgender Formel: OD bei 260_{nm} x V x F

OD = optische Dichte; V = Verdünnungsfaktor; F = Multiplikationsfaktor (50 für ds DNA; 40 für RNA); K = Kontrollpflanzen; S = über 48 h mit 250 mM NaCl gestressten *A. arenaria*- Pflanzen; R = über 6 h rehydrierten *A. arenaria*- Pflanzen

Probe	230 nm	260 nm	280 nm	RNA-Gehalt [µg/ml]
K1	0,0071	0,0261	0,01	0,2088
K2	0,0125	0,0327	0,0135	0,2616
S1	0,061	0,136	0,080	1,089
S2	0,119	0,304	0,178	2,428
R1	0,119	0,312	0,181	2,494
R2	0,116	0,300	0,177	2,402

Gekürztes Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Zusammensetzung des KM-Mediums

Tab. 2.2 Bedingungen der Oberflächensterilisation für *A. arenaria*

Tab. 2.3 Zusammensetzung des Czapek-Dox-Mediums in *aqua dest.*

Tab. 2.4 Bedingungen der HPLC-Analyse von freien Aminosäuren

Tab. 2.5 Die bei der Kalibrierung der Säule verwendete Referenzzucker und -Zuckeralkohole sowie ihre Retentionszeiten

Tab. 2.6 Substanzen, die bei dem gekoppeltem GK / GPR– Assay verwendet wurden.

Tab. 2.7 Die PCR-Bedingungen sowie die Primer, die bei der Amplifikation von der 28S-rDNA- und ITS-Region der untersuchten Pilzisolat e eingesetzt wurden.

Tab. 2.8 Die Pflanzenarten sowie die GenBank accession Nummern von EST´s - Sequenzen, die zur Konstruktion von den Primern für die *AaPDH* - Amplifikation herangezogen wurden

Tab. 2.9 Sequenzen von den neuen Primern zur Amplifikation der PDH-Region bei *Ammophila arenaria* sowie die PCR-Bedingungen

Tab. 2.10 Die Pflanzenarten sowie die GenBank accession Nummern von Nucleotidsequenzen, die zur Konstruktion von den Primern für die β -Tubulin-Amplifikation bei *A. arenaria* herangezogen wurden.

Tab. 2.11 Sequenzen der Primer, die bei der Amplifikation der PDH- 18S-rRNA- und β -Tubulin-Region bei *A.arenaria* verwendet wurden sowie die RT-PCR-Bedingungen

Tab. 3.1 Genus bzw. Art, Herkunft sowie Anzahl der aus *A. arenaria* isolierten Pilzisolat e

Tab. 3.2 Pilzgattungen bzw. –Arten die in die interne Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie (TUB) aufgenommen wurden sowie die zugehörigen Katalognummern und Herkunftsorte.

Tab. 3.3 Resultate der BLAST-Suche mit den erhaltenen 28S-rDNA und ITS-Sequenzen, die eine Artbestimmung von den ausgewählten Pilzisolat en ermöglichte.

Tab. 3.4 Sequenzanalyse der Klone 1, 2, 6 und 7 sowie die die Fragmentenlängen in bp.

Tab. 4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse, die für die ausgewählten Parameter des *A. arenaria*- Metabolismus ermittelt wurden.

Gekürztes Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Relative Biomasse von vier diversen Pflanzenspezies in Abhängigkeit von der Bodensalinität.
- Abb. 2.1** Wachstum von *Ammophila arenaria* in Plastiktöpfen Phytacón
- Abb. 2.2** Schema der Experimente zur Versuchsreihe A
- Abb. 2.3** Schema der Experimente zu den Versuchsreihen B – C.
- Abb. 2.4** Schema der Experimente zur Versuchsreihe
- Abb. 2.5** Schema der Versuche, die zur Bestimmung der Expressionsregulation von *AaPDH* in Kurzzeitversuchen (über 48 h) durchgeführt wurden
- Abb. 2.6** Aufarbeitungsschema zur Extraktion von freien Aminosäuren sowie zur Untersuchung der spezifischen Aktivität von Fd-GOGAT
- Abb. 2.7** HPLC-Chromatogramm mit Peaks, die den Retentionszeiten von 17 eingesetzten Referenz-L-Aminosäuren entsprechen
- Abb. 2.8** Aufarbeitungsschema der Zucker- und Zuckeralkoholextraktion
- Abb. 2.9** HPLC-Chromatogramm mit Peaks, die den Retentionszeiten der 8 eingesetzten Referenz-Kohlenhydrate entsprechen.
- Abb. 2.10** Sequenz der putativen Prolinoxidase aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. NM197664) und die Positionierung von den neu konstruierten *AaPDH*-Primern.
- Abb. 2.11** Alignment von den Prolindehydrogenase-Proteinsequenzen aus monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen zur Untersuchung von Homologien unter den Proteinen sowie zur Veranschaulichung von konservierten Regionen innerhalb der Sequenzen.
- Abb. 2.12** Alignment von β -Tubulin-Sequenzen aus monokotyledonen Pflanzenarten zur Überprüfung von Sequenzhomologien sowie zur Primerkonstruktion, die bei der Amplifikation der β -Tubulin-Region von *A. arenaria* verwendet wurden.
- Abb. 3.1** Prozentuales Verhältnis von Pilzgattungen bzw. -Arten, die aus gesunden *A. arenaria* – Pflanzen isoliert wurden
- Abb. 3.2** Längsschnitte von *A. arenaria* – Blattsegmenten, die in den Infektionsversuchen TUB6911 und *G. graminis* TUB6935 überwachsen wurden.
- Abb. 3.3** Darstellung von zwei *A. arenaria* - Pflanzen, die über vier Wochen unterschiedlich kultiviert wurden
- Abb. 3.4** Gebildete Biotrockenmassen nach der Kultivierung von *A. arenaria* - Pflanzen im M&S-Medium ohne Salz bzw. mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen sowie nach der Inokulation der Pflanzen mit ausgewählten Pilzisolaten
- Abb. 3.5** Wachstum von *A. strictum* und *F. culmorum* in Czapek-Dox Medium ohne bzw. mit 0,75 M
- Abb. 3.6** Beispiel für das Wachstum von Pilzisolaten (hier *M. bolleyi* TUB6930) auf KM-Agar ohne Salz bzw. mit verschiedenen NaCl- Konzentrationen:
- Abb. 3.7** Wachstumsraten [mm/Tag] von den Isolaten *A. strictum* TUB6911, *F. culmorum* TUB6927, *M. bolleyi* TUB6930 und *G. graminis* TUB6935 in Abhängigkeit von der Mediumsalinität.

- Abb. 3.8** Veränderungen in den Gehalten von acht verschiedenen L-Aminosäuren in *A. arenaria* in Abhängigkeit von Salzstress und / oder Inokulation mit den Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.9** L-Pro- L-Glu- und L-Gln-Gehalte in Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums und / oder einer Inokulation mit endophytischen bzw. mit pathogenen Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.10** L-Asp- L-Ser- und L-Ala-Gehalte in Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums und / oder einer Inokulation mit endophytischen bzw. pathogenen Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.11** L-Asn- und L-Val-Gehalte in Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums und / oder einer Inokulation mit endophytischen bzw. mit pathogenen Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.12** Aminosäuregehalte von *A. strictum* TUB6911 in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Czapek-Dox-Mediums, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.13** Aminosäuregehalte von *F. culmorum* TUB6927 in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Czapek-Dox-Mediums, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.14** D-Saccharose-, D-Glucose- und D-Fructosegehalte in den Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums und / oder einer Inokulation mit endophytischen bzw. mit pathogenen Pilzisolaten, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.15** D-Mannitolgehalte von den ohne Pilzinokulation (Kontrolle) bzw. mit den Pilzisolaten besiedelten *A. arenaria*- Pflanzen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des M&S-Mediums und bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM).
- Abb. 3.16** Spezifische Aktivität von Fd-GOGAT in den Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums und / oder einer Inokulation mit endophytischen bzw. mit pathogenen Pilzisolaten, bezogen auf den Proteingehalt
- Abb. 3.17** Spezifische Aktivität der P5CS in den Extrakten aus *A. arenaria* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des M&S-Mediums und / oder einer Inokulation mit endophytischen bzw. mit pathogenen Pilzisolaten. Gezeigt sind ebenfalls die Gehalte an L-Prolin, bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Kontrolle = 100 %
- Abb. 3.18** PCR-Produkte, die mittels (A) ITS- und (B) 28S-rDNA-Region spezifischer Primer zur Identifizierung der verwendeten Pilzisolate amplifiziert wurden.
- Abb. 3.19** PCR-Produkt, das nach einer Amplifikation der genomischen DNA aus *A. arenaria* mit dem neuen Primerpaar GP240 – GP310 entstanden ist.
- Abb. 3.20** Überprüfung der DNA-Qualität, -Menge sowie Insertgröße nach einem Restriktionsverdau der Plasmide mit EcoRI. Die auf das 1,2 % (w/v) Agarosegel aufgetragene Klon-DNA (jeweils 15 µL) wurden von 1 bis 10 durchnummeriert.
- Abb. 3.21** Ergebnis der PCR-Reaktion mit den neuen Primern GP240 und GP310 zur Amplifikation der PDH-Region von *A. arenaria*.
- Abb. 3.22** BLAST-Suche mit der zu Basis stehenden Sequenzen von Klon 2 (NCBI-Datenbanken).
- Abb. 3.23** Alignment von Klon- und Prolinoxidase-Sequenz aus *Oryza sativa* (GenBank accession No. NM197664) zum Vergleich von erhaltenen Klonsequenzen sowie zur Optimierung von Primern, die bei der Amplifikation von AaPDH verwendet wurden.

Abb. 3.24 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR, bei der die cDNA aus *A. arenaria* mit spezifischen Primern für die AaPDH, 18S-rRNA sowie β -Tubulin – Gene in jeweils zwei Parallelen amplifiziert wurde.

Abb. 3.25 Ergebnis der PCR mit den Primern zur Amplifikation der 18S-rDNA (A) und β -Tubulin-Region (B) bei *A. arenaria*

Abb. 3.26 Alignment von β -Tubulin-Sequenzen aus monokotyledonen Pflanzern, die zur Primerkonstruktion herangezogen wurden, mit den beiden sequenzierten β -Tubulin-Amplifikaten (Tubulin_1 und Tubulin_2)

Abb. 3.27 Alignment von Klonsequenzen und der AaPDH-Sequenz, die in der RT-PCR mit dem Primerpaar GP240N – GP310N und mit der cDNA als Template amplifiziert wurde.

Abb. 4.1 Aufbau des rDNA-Komplexes bei den Pilzen

Abb. 4.2 Vereinfachtes Schema des 28S-rRNA-Gens. Die Kästchen repräsentieren die variablen, die Linien die konservierten Regionen. Die bei der Identifizierung verwendete Region wurde grau markiert.

Abb. 4.3 Kontrollpunkte, an denen die Pflanze den Salz-Transport reguliert.

Abb. 4.4 Das idealisierte Verhältnis zwischen Wachstum und Wasserpotential.

Abb. 4.5 Prolinbiosynthese und -Abbau bei Pflanzen und Bakterien

Abb. 4.6 Genomische Ansicht der fünf Chromosome von *Arabidopsis thaliana*

Abb. 4.7 Genomische Ansicht der zehn Chromosome von *Oryza sativa* (Reis). Die Lage der putativen Prolinoxidase auf Chromosom 10 wurde rot markiert

